

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION DE MÉDICAMENTS INTERAGISSANT SUR LA

GÉNOTOXICITÉ DU BENZO(A)PYRÈNE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

LYLEN GADOUCHE

AOÛT 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

A mon fils Adam ma raison de vivre.

Je dédie ce manuscrit à mes parents, frères et à ma sœur. Je tiens également à remercier les personnes suivantes pour leur précieux support lors de la réalisation de ce travail de recherche :

Dr. Sami Haddad

Professeur TOXEN – Université du Québec à Montréal

Dr. Catherine Jumarie

Professeur TOXEN – Université du Québec à Montréal

Dr. Elsy Edward

Professeur BIOMED – Université du Québec à Montréal

Marc André Verner

Étudiant en Doctorat Université du Québec à Montréal

Marc Mantha et Louise Falstrault

Techniciens en biochimie Université du Québec à Montréal

Isabelle Rheault

Technicien en biochimie Université du Québec à Montréal

Dr Mohamed Ali Ali Benali

Chercheur post doctoral Université du Québec à Montréal

Khalil Kane et Daniel Mauvoisin

Étudiants en Doctorat Université du Québec à Montréal

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
RÉSUMÉ	x
PROBLÉMATIQUE	1
CHAPITRE I.....	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
1.1 Le benzo(a)pyrène.....	3
1.2 Sources d'expositions au benzo(a)pyrène.....	4
1.3 Toxicocinétique du B(a)P	5
1.3.1 Absorption et distribution	5
1.3.2 Métabolisme du benzo(a)pyrène	5
1.3.2.1 Les époxydes et les hydrodiols	8
1.3.2.2 Les phénols et les quinones.....	9
1.3.2.3 Conjugués au glutathion et à l'acide mercapturique.....	9
1.3.2.4 Conjugués glucuroniques et sulfatés.....	10
1.3.3 Élimination.....	11
1.4 Les effets du Benzo(a)pyrène	11
1.4.1 Benzo(a)pyrène et cancers	11
1.4.1.1 Mode d'action du benzo(a)pyrène dans la cancérogenèse.....	12
1.4.1.2 Mode d'action du B(a)P via le récepteur Aryl Hydrocarbon.....	14
1.4.1.3 Les profils de mutations	18
1.4.2 Autres effets pathologiques du benzo(a)pyrène.....	18
1.5 B(a)P et interactions médicamenteuses.....	19
1.5.1 Choix des médicaments.....	19
1.5.1.1 Métabolisme des médicaments choisis	20
1.6. Méthodes pour mesurer le pouvoir mutagène des génotoxiques.....	22
1.6.1 Méthodes cellulaires.....	22
1.6.1.1 Le test de Ames.....	22
1.6.1.2 Le test des comètes	22

1.6.1.2 Méthodes analytiques	23
CHAPITRE II	24
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
2.1 Objectifs et hypothèses de travail	24
2.2 Matériels et méthodes	25
2.2.1 Produit chimiques et réactifs	25
2.2.2 Culture cellulaire	25
2.2.3 Détection des adduits	25
2.2.4 Préparation du B(a)P	26
2.2.5 Détermination de la viabilité	26
2.2.6 Exposition cellulaire au benzo(a)pyrène	27
2.2.6.1 Détermination de la cinétique de formation des adduits	27
2.2.6.2 Co-incubation en présence de médicaments	28
2.2.7 Extraction de l'ADN génomique	30
2.2.8 Dosage de protéines	30
2.2.9 Dosage de l'ADN	30
2.2.10 Dosage radiométrique	30
2.2.11 Traitement des données et analyse statistique	31
CHAPITRE III	32
RÉSULTATS	32
3.1 Cinétique de formation des adduits	32
3.2 Identification des interactions métaboliques	33
CHAPITRE IV	37
DISCUSSION ET CONCLUSION	37
4.1 Raffinement de la méthode	37
4.2 Cinétique de formation des adduits	39
4.3 Interactions médicamenteuses	40
4.4 Conclusion	44
BIBLIOGRAPHIE	46

LISTE DES ABREVIATIONS

AhR : Aryl hydrocarbon receptor

ARNT : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

AKR : Aldo-céto réductases

B(a)P : Benzo(a)pyrène

BPDE : Benzo(a)pyrène diol époxyde

Cmax : Concentration plasmatique maximale

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

HAP : Hydrocarbure polycyclique aromatique

HEF1 : Human enhancer of filamentation 1

HepG2 : Cellules de Carcinome Hépatocellulaire Humain

Hsp : Heat shock protein

GEF : Guanine nucleotide exchange factor

GST : Glutathion-S-transférase

IARC : Agence internationale pour la recherche sur le cancer

Ki : Constante d'inhibition

MAP3K8 : Mitogen-activated protein kinase 8

MEM : Minimum Essential Medium

MT-II :Métallothionine II

NAPQI : N-acetyl-benzoquinoneimine

NEK2 : Serine/threonine-protein kinase

NER : Nucleotide excision repair

PAPS : 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

PBS : Phosphate buffered saline

PAI1 : Plasminogène type I

SDS : Sodium dodécyl sulfate

TNF : Tumor necrosis factor

TP53 : Tumor protein 53

TRIS-E : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane/ Acide éthylène diamine tetra acétique

UDPGA : Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique

XRE : Xenobiotic response element

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1 Structure moléculaire du B(a)P.....	4
2 Métabolisme du B(a)P.....	7
3 Métabolisme du B(a)P.....	8
4 Structure chimique des 4 stéréo-isomères d'adduits BPDE-ADN.....	13
5 Mode d'action du B(a)P via le récepteur <i>Aryl Hydrocarbon</i>	16
6 Mécanisme d'action du B(a)P.....	17
7 Schéma représentant la méthode utilisée pour la détection des adduits à l'ADN de B(a)P radiomarqué.....	28
8 Cinétique de formation d'adduits à l'ADN.....	33
9 Impact de la présence de médicaments sur la formation d'adduits à l'ADN après 6 h d'incubation.....	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
1	Concentration maximale à dose thérapeutique des médicaments.29
2	Test de T non apparié entre les cellules traitées au 7,10 14C B(a)P (contrôles) et les cellules traitées au 7,10 14C B(a)P plus le médicament.....36
3	Concentrations (\pm écart-type) en protéines des milieux d'incubation lors de co-exposition aux médicaments qui ont révélé des interactions.....36

RÉSUMÉ

Le Benzo(a)pyrène (B(a)P) est un hydrocarbure polycyclique aromatique (HAP). Il provient de la combustion incomplète de matériaux organiques, de la circulation automobile, du chauffage domestique, du tabagisme et de l'alimentation. Il est métabolisé principalement dans le foie. Il existe pour le B(a)P trois voies métaboliques : la monooxygénation, la voie des peroxydases et la voie des quinones. Une fois le B(a)P biotransformé, ses métabolites sont conjugués principalement au glutathion, au PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) et l'UDPGA (acide uridine 5'-diphosphoglucuronique). On connaît le pouvoir cancérogène et génotoxique du B(a)P, cependant, certains médicaments pourraient interférer dans une ou plusieurs voies métaboliques utilisées par ce dernier, voire même dans le processus de réparation de l'ADN lors de la formation d'adduits ADN-BPDE (BPDE : benzo(a)pyrène diol époxyde) chez l'humain. Les connaissances actuelles concernant le potentiel d'interactions des médicaments sur le pouvoir cancérogène du B(a)P restent minimes. Très peu d'information existe sur les interactions métaboliques entre le B(a)P et médicaments pouvant affecter le taux de formation des adduits à l'ADN.

Les objectifs de cette étude consistent à mettre au point une méthode analytique spécifique pour mesurer le taux de formation d'adduits ADN-B(a)P et à l'appliquer pour identifier des médicaments susceptibles d'interférer dans ce processus. Pour cela, on incube des lignées cancéreuses d'hépatocytes humains (HepG2) pendant 6 h en présence de 30 μM de 7-10 ^{14}C B(a)P (doublement marqué en C7 et en C10) seul ou en présence du médicament à tester (la concentration du médicament = 10 x la concentration maximale plasmatique thérapeutique). La gamme de médicaments sélectionnée a un large spectre de consommation dans le monde. Cette gamme est composée de: l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, l'acide méfénamique, le naproxène, l'acide valproïque, le carbamazépine, le gliclazide et la théophylline. La mesure du taux de formation d'adduits à l'ADN s'est faite par détection radiométrique sur de l'ADN isolée. On a aussi comparé les taux d'adduits formés dans les échantillons témoins (exposé seulement au B(a)P) à ceux formés en présence de médicaments.

A l'aide de la méthodologie développée, nous avons observé que pour certains passages de culture cellulaires (HepG2), l'ibuprofène augmente substantiellement le taux de formation d'adduit à l'ADN du B(a)P (jusqu'à 2.3 fois), alors que le naproxène et l'acide méfénamique ont plutôt un effet protecteur (jusqu'à 0.5 fois pour le naproxène et 0.7 fois pour le l'acide méfénamique). Ces résultats suggèrent que la consommation chronique de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens pourrait augmenter (ibuprofène) ou diminuer (naproxène et acide méfénamique) le risque carcinogène.

Ceci est la première étude qui se consacre à déterminer les interactions du B(a)P avec neuf médicaments. Des études plus poussées sur la cinétique de réparation de l'ADN et sur la caractérisation des différentes interactions aboutiraient à une meilleure évaluation du risque toxicologique du B(a)P.

Mots clés : Bezopyrene, interactions, adduits, AINS.

PROBLÉMATIQUE

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) sont des composés ubiquistes et des polluants de l'environnement en raison de leurs propriétés cancérigènes et mutagènes. Ils se distinguent par un mélange de molécules, issues de phénomènes de combustion (ex tabagisme, combustion, charbon et pétrole utilisés en industrie). Parmi ces HAP, figure le benzo(a)pyrène (B(a)P). Sa biotransformation par différentes voies, conduit à des métabolites époxydiques impliqués dans la génotoxicité. En effet, ces derniers se lient de manière covalente à l'ADN provoquant des mutations qui en cas de non réparation provoqueront le cancer. Étant donné que certains médicaments peuvent emprunter les mêmes voies métaboliques que le B(a)P, il n'est pas exclu qu'une coexposition au B(a)P et à certains médicaments favoriserait la formation d'adduits qui serait à l'origine de l'augmentation de la génotoxicité du B(a)P qui serait responsable du développement de différents cancers.

Les données publiées par l'Institut Canadien d'Information sur la santé (ICIS), attestent de l'augmentation des dépenses en termes de médicaments dans les ménages canadiens (ICIS, 2010). En effet, les dépenses en médicaments prescrits au Canada ont atteint 30 milliards de dollars en 2009, ce qui représente une hausse de 1,42 milliard de dollars par rapport à 2006. Cela démontre en partie que la consommation de médicaments a augmenté au Canada comparativement aux années précédentes. Le Québec se trouve en tête peloton des dépenses avec environ 699 dollars par habitant. La population au Québec consomme en moyenne pas moins de 750 comprimés par personne et par année, toute classe de médicaments confondue (ICIS). En associant l'ubiquité des HAP à l'augmentation annuelle des dépenses en médicaments au Canada, il serait légitime de s'interroger sur l'effet de ces derniers sur l'incidence de la toxicité des HAP. Plusieurs études ont été réalisées sur l'impact des HAP sur les médicaments; il en découle au final que les hydrocarbures polycycliques aromatiques provoquent des interactions, des modifications pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sur certaines classes de médicaments (Zevin *et al*, 1999). Ces interactions peuvent avoir des ;34(2):417-25.

effets secondaires non négligeables sur la santé (p.ex: thromboembolie dans le cas d'association de contraceptifs oraux et HAP; (Gaudoneix *et al*, 2001).

Malheureusement, peu de chercheurs se sont penchés sur l'amplification ou sur la diminution de la génotoxicité du B(a)P suite à la prise de médicaments. Lors des quatre dernières années, des études ont démontré à l'aide de lignées cellulaires, la présence significative d'altérations au niveau de l'ADN suite aux interactions probénécide-B(a)P et verapamil-B(a)P (Myllynen *et al*, 2006). En effet, l'expression de la p53 augmente après l'exposition du B(a)P à ces deux médicaments indiquant la présence d'altération au niveau de l'ADN de la lignée MCF-7 (lignée d'adénocarcinomes du sein). Aussi, le probénécide augmente la formation d'adduits à l'ADN via l'inhibition de la glucuronidation (Myllynen *et al*, 2006). Il a aussi été démontré que, l'omeprazole joue un rôle protecteur par rapport à la génotoxicité du B(a)P chez les hépatocytes de rats (Kazuhiro *et al*, 2008) En définitive, beaucoup reste à faire dans le domaine des interactions entre médicaments et HAP.

Le présent projet de recherche a pour objectif de développer une méthode afin d'identifier les interactions toxiques entre le B(a)P et les médicaments grandement consommés, c'est-à-dire ceux utilisés pour certaines maladies chroniques et ceux utilisés sans prescription médicale (exemple l'acétaminophène). L'étude portera sur les médicaments fréquemment utilisés dans différents traitements de maladies. Parmi ces médicaments figurent :

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens: acétaminophène, ibuprofène, naproxène, acide méfénamique.
- L'antipyrétique acide salicylique
- L'hypoglycémiant glyclazide.
- Les antiépileptiques : carbamazépine, acide valproïque.
- Le bronchodilatateur théophylline.

Le choix du B(a)P, est justifié, par le fait qu'il soit très mutagène, très cancérigène et ubiquiste dans l'environnement. Aussi, la littérature a mis en évidence les effets génotoxiques du B(a)P. Ces derniers, peuvent facilement être étudiés *in vitro*, sur des modèles de lignées cellulaires tels que les HepG2.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le benzo(a)pyrène

Le B(a)P fait partie de la classe des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces derniers comprennent deux ou plusieurs noyaux aromatiques unis, où des noyaux adjacents partagent deux ou plusieurs atomes de carbone (Figure 1). Le B(a)P est un composé chimique solide qui a un poids moléculaire de 252.32 g/mol, a une solubilité (Log P) égale à 6 et a un point de fusion de 179°C; il est soluble dans les hydrocarbures aromatiques, cependant sa solubilité dans l'eau est faible (0,2 à 6,1 mg/L). Il est constitué de deux régions qui sont des sites de réactions chimiques (Miller *et al*, 2001) (voir Figure 1). La région k est la région comprise entre le quatrième et cinquième carbone. Cette région est une zone de grande densité électronique et de haute activité métabolique. La région baie est la région comprise entre le neuvième et le douzième carbone. Elle est considérée comme étant très réactive.

La biotransformation du B(a)P génère des métabolites qui sont impliqués dans la génotoxicité. Il est classé dans le groupe 1 (cancérigène) par l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC, 1983).

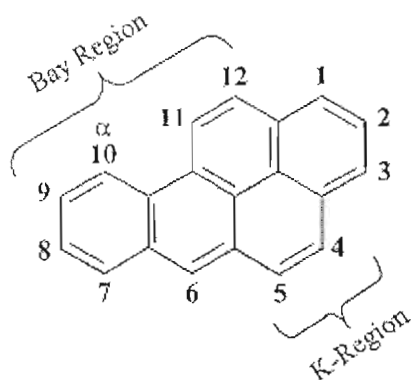


Figure 1. Structure moléculaire du benzo(a)pyrène (tiré de Miller *et al*, 2001).

1.2 Sources d'expositions au benzo(a)pyrène

Le B(a)P est généré lors la combustion de la matière organique. Ainsi, on le retrouve dans la suie et les fumées de toutes origines (gaz d'échappements, fumée de cigarette etc.) (Bisson *et al*, 2006). À 300 °C et 600 °C, il est, un produit de combustion incomplète. Les sources d'exposition peuvent être environnementales ou professionnelles.

L'être humain est en contact permanent avec les HAP se retrouvant dans l'environnement. Il y'a des sources naturelles d'émission de HAP qui sont essentiellement dues aux éruptions volcaniques et aux feux de forêts. Le B(a)P est également synthétisé par des plantes, des bactéries et des algues (Bisson *et al*, 2006).

La présence de HAP dans l'environnement est aussi d'origine anthropique, ceux-ci émanent de la circulation automobile, du chauffage domestique, du tabagisme et surtout de l'alimentation (lait, viandes fumées, etc), du raffinage du pétrole, du schiste, utilisation du goudron, du charbon, du coke, des revêtements routiers, des échappements des machines à moteur thermique, des huiles moteur et des carburants (Bisson *et al*, 2006).

En milieu de travail, les personnes les plus particulièrement exposées au B(a)P sont les travailleurs dans les alumineries, les pompiers et les ouvriers du secteur de la pétrochimie et de la sidérurgie. Plusieurs études épidémiologiques en milieu professionnel ont démontré une association tangible entre cancer et HAP. En effet, ces derniers sont responsables de l'atteinte chez l'homme de plusieurs formes de cancers (Luch, 2005). Par exemple, plusieurs maladies telles que le cancer de l'œsophage et de l'estomac ont été reliées à l'ingestion d'aliments fumés (Thyssen *et al*, 1981).

1.3 Toxicocinétique du B(a)P

1.3.1 Absorption et distribution

Le B(a)P est rapidement absorbé par les voies respiratoire, digestive ou cutanée. Il a été démontré sur un modèle *in vitro* de peau d'origine humaine que 3 % d'une dose d'exposition de B(a)P est absorbé après 24 heures (Pichard, 2006). On retrouve la substance dans les canaux lymphatiques thoraciques 3 h après une administration intragastrique (Bonnard *et al*, 2007). Lorsqu'inhalé, son absorption est rapide, cependant, sa vitesse d'absorption dépend de la taille des particules sur lesquelles le B(a)P est adsorbé (IARC, 1983). Étant lipophile, le B(a)P traverse les barrières pulmonaire et intestinales par diffusion passive. Il est ensuite rapidement distribué via le sang dans les ganglions lymphatiques thoraciques, le tractus respiratoire, les reins, le cerveau, les testicules et la rate (Bonnard *et al*, 2007). Les LDL facilitent le transport du B(a)P vers les fibroblastes et empêchent son absorption vers les hépatocytes contrairement au HDL qui le transporte vers le foie (Busbee *et al*, 1990). Le B(a)P est aussi stocké dans les glandes mammaires et les organes riches en graisses. Par la suite, il est graduellement libéré des graisses vers la circulation sanguine (IARC, 1983).

1.3.2 Métabolisme du benzo(a)pyrène

Une fois dans la cellule, le B(a)P est métabolisé en différents métabolites : époxydes, hydrodiols, phénols, ainsi qu'en métabolites conjugués au glutathion, au sulfate et à l'acide

glucuronique. Le B(a)P est biotransformé et activé par trois voies enzymatiques (Figure 2) (Jiang *et al*, 2007) :

- 1) la voie des peroxydases (e.g., cytochrome P450 peroxydase) pour former les radicaux cations,
- 2) la voie de formation des diol-époxydes qui se fait par les cytochromes P450/1A1/1B1 par la mono-oxygénation et par les époxydes hydrolase.
- 3) la voie de formation des o-quinones qui se fait par les cytochromes P450/1A1/1A2/1B1 par la mono-oxygénation, par les époxydes hydrolases, et par les l'aldo-céto réductases (AKRs).

L'activation métabolique du B(a)P peut se faire par oxydation monoélectronique engendrant ainsi un radical cation capable de se lier avec des macromolécules pour initier le processus de carcinogenèse. Elle peut être aussi le résultat d'une oxydation biélectronique ou d'une mono-oxygénation. Ces deux dernières sont à l'origine de la formation de métabolites oxygénés (Cavalieri *et al*, 1985). Ces métabolites oxygénés peuvent former l'ultime carcinogène. Ils peuvent aussi subir successivement une série de réactions d'oxydations monoélectroniques, d'oxygénation ou d'estérification qui leurs confèrent à la fin un pouvoir génotoxique (Cavalieri *et al*, 1985).

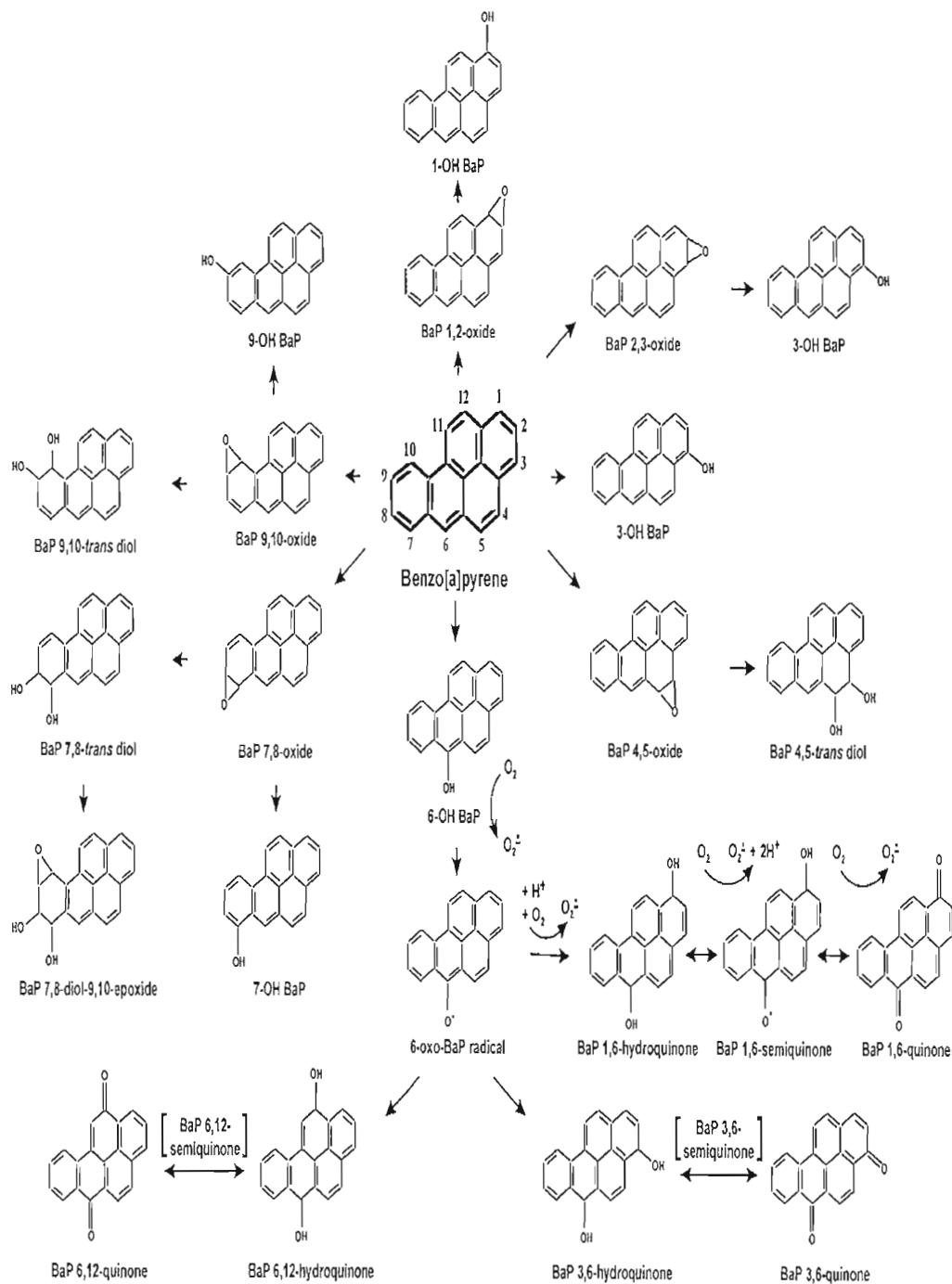


Figure 2. Métabolisme du B(a)P (tiré de Miller *et al*, 2001).

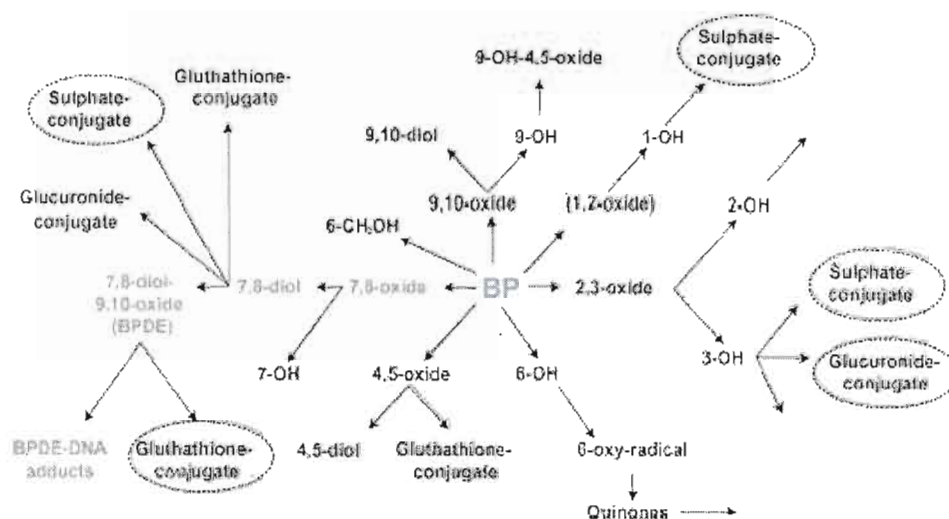


Figure 3. Métabolisme du B(a)P (tiré de Myllynen *et al*, 2006).

Les radicaux cations et les diol-époxydes vicinaux de la région baie du B(a)P (i.e., région entre les carbone 10 et 11 du B(a)P (Figure 2); sont formés respectivement par oxydation mono et biélectronique (Cavalieri *et al*, 1985). La formation de radicaux cations se fait selon le potentiel d'ionisation du HAP (il faut qu'il soit inférieur à 7.35 EV). C'est la localisation de la haute charge du radical cation qui va déterminer la réactivité spécifique au nucléophile ainsi que, la sélectivité de la substitution nucléophile.

1.3.2.1 Les époxydes et les hydrodiols

La formation d'époxydes est catalysée par le CYP1A1. Les différents époxydes qui en résultent sont les 1,2-2,3-4,5-7,8 et 9,10 oxydes. Par la suite, l'hydratation des époxydes donne lieu à la formation des hydrodiols (Grover, 1986). Cette réaction est catalysée par l'enzyme époxyde hydrolase microsomale avec une moindre contribution de la forme cytoplasmique. Alors que certains époxydes du B(a)P s'isomérisent en phénols pour ensuite devenir des dihydrodiols, d'autres resteront avec qu'une seule fonction hydroxyle. Les

époxydes en région K donneront les B(a)P 4,5 trans diol qui sont de très bons substrats pour la glutathion-S-transférase (GST) (Grover, 1986).

1.3.2.2 Les phénols et les quinones

La plupart des phénols proviennent de l'isomérisation des époxydes comme les 3-, 7- et 9-dérivés hydroxylés qui proviennent des 2,3-, 7,8- et 9,10-oxides. La formation de phénols dépend du taux d'oxydation du métabolite époxyde, de la stabilité de ce dernier, de la direction de l'isomérisation et du taux d'élimination de cet époxyde par conjugaison au glutathion ou former un diol (Grover, 1986).

Le très réactif 6-OH-B(a)P n'a jamais pu être isolé. La formation des BP-1,6-quinones, BP-3,6-quinone et le BP-6,12-quinones se fait par un transfert d'électron au complexe oxygène cytochrome P450 qui, sous sa forme réduite est très nucléophile et réagit avec le 6-hydroxy-BP au niveau du carbone 6 où la charge positive est bien localisée. Le 6-hydroxy-BP se dissocie du cytochrome qui redevient à l'état ferrique, puis une auto-oxydation a lieu au niveau du C1, C3, C12 engendrant des diones (Cavaliere *et al*, 1985).

1.3.2.3 Conjugués au glutathion et à l'acide mercapturique

La conjugaison au glutathion de diol époxydes et de triol époxydes est catalysée par la GST (Grover, 1986). En général, la région K (i.e., située entre les carbones 4 et 5, voir Figure 1) est un excellent substrat pour le glutathion.. Cette dernière se retrouve dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Elle se trouve également en grandes concentrations dans tous les tissus. L'isoforme glutathion-S-transférase pi (GSTP) catalyse spécifiquement la détoxification des diols-époxydes électrophiles (Ritchie *et al*, 2007).

Le BP-4,5-oxyde est facilement converti en conjugué au glutathion, ce qui n'est pas le cas des 7,8-époxydes. et 9,10-époxydes. Avant leur excrétion dans les urines, les conjugués au glutathion sont transformés en acides mercapturiques (Grover, 1986).

1.3.2.4 Conjugués glucuroniques et sulfatés

Les époxydes qui ne sont pas conjugués au glutathion peuvent être transformés en phénols et dihydrodiols. Pour faciliter leur excrétion, ces derniers sont conjugués à l'acide glucuronique ou au sulfate, ce qui augmente leur polarité (Grover, 1986). La glucuronidation est médiée par des isoenzymes de l'UDP-glucuronyltransférase (UGT) et nécessite l'acide uridine 5'-diphosphoglucuronique (UDP-GA) comme cofacteur. On retrouve les UGT au niveau du rein, du foie et des autres tissus tels que l'intestin, le rein, la peau, le cerveau, la rate et la muqueuse nasale (Klaassen, 2008). Certains composés conjugués peuvent se lier à l'ADN après hydrolyse enzymatique. C'est le cas du 3-hydroxy-B(a)P-glucuronide qui se lie de manière covalente à l'ADN (Grover, 1986). Dans le foie l'UGT1A1 et l'UGT1A9 ont une activité spécifique envers le benzo(a)pyrene-trans-7R,8R-dihydrodiol. Il existe différentes variantes de l'UGT1A1. Les personnes ayant le génotype UGT1A1 (*1/*1) ont une grande activité de conjugaison comparé à la variante allélique UGT1A1*28 (Fang *et al*, 2004).

Les sulfo-transférases sont des enzymes cytosoliques dont le cofacteur est le 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS). La sulfatation produit un ester sulfurique très soluble dans l'eau. Certains dérivés du benzopyrène hydroxylés sont sulfoconjugués. Les quinones doivent être réduites avant d'être sulfo- ou glucurono- conjugués (Grover, 1986).

Les composées hydroxylés dérivés du B(a)P passent par une série d'oxydation et d'hydroxylation dans différents compartiments cellulaires. Par exemple, le 7,8-diol-B(a)P se transforme en 7,8-diol-9,10-époxydes par l'oxydation de la double liaison olefinique 9,10 (Sims *et al*, 1974). Ce dernier va subir d'autres hydroxylations et donner des triols époxyde avec des groupements OH en C1 ou C3 (Jernstrom *et al*, 1984). Le 3-hydroxy-BP et le 9-

hydroxy-BP peuvent engendrer également le 3,9-diphénols (Capdevilla *et al*, 1978). Le 9-hydroxy-BP engendre dans certains cas aussi le 4,5-diol-BP et 4,5-époxyde-BP. Ce dernier dans le foie de rat peut également se transformé en 4,9-et 5,9-diphénols à travers la région K (Jernstorm *et al*, 1978). *In vivo*, le 3-hydroxy-BP, le 7,8-diol et le 3,5-diphénol sont excrétés dans la bile (Ribeiro *et al*, 1985).

1.3.3 Élimination

Dépendamment de la voie d'exposition, le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal sont les principales voies d'élimination du B(a)P (Bonard *et al*, 2002). Après une administration orale de 100 mg/ kg de B(a)P chez le rat, 45% de la dose est excrétée dans les urines et les fèces après 24 h. Comparativement aux diols, un taux élevé de métabolites hydroxylés est détecté dans les urines et les fèces (Ramesh *et al*, 2001). La majorité de métabolites sont éliminées dans les fèces (70 à 75% d'une dose sous-cutanée chez la souris), la voie d'excrétion urinaire est cependant mineure (Ramesh *et al*, 2001). Les métabolites polaires et phénoliques représentent respectivement 60 et 20% de la radioactivité détectée dans les urines. Il est estimé que 80 % du B(a)P métabolisé (métabolites polaires et dérivés phénoliques) est éliminé par la voie urinaire. La forme non métabolisée de B(a)P reste cependant très faible (Yamazaki et Kakiuchi, 1989). L'élimination est moins rapide dans les tissus faiblement perfusés comparée à ceux richement perfusés (Bartosek *et al*, 1984). Il n'y a pas d'élimination via l'air expiré (Bonard *et al*, 2002).

1.4 Les effets du Benzo(a)pyrène

1.4.1 Benzo(a)pyrène et cancers

Au XVIII^{ème} siècle, le cancer du scrotum des ramoneurs de Londres a été l'un des premiers cancers professionnels identifiés. Il était dû à l'absorption cutanée des HAPs se trouvant dans la suie. Les cancers de la vessie, des voies nasales ou du poumon surviennent après inhalation d'HAP provenant de la combustion incomplète de matériaux organiques. On

trouve plus fréquemment ce genre de cancers chez les pompiers, les travailleurs du secteur de la pétrochimie et de la sidérurgie. Une exposition par inhalation de 45.6 mg/m^3 de B(a)P s'avère toxique et cancérigène (cancers du larynx, pharynx et œsophage) chez les hamsters (Thyssen *et al*, 1981). Chez les travailleurs en aluminerie exposés aux HAP, un risque accru de décès par cancer (risque relatif de 6.9), en particulier broncho-pulmonaire, a été mis en évidence par des études épidémiologiques rétrospectives (Bertrand *et al*, 1987).

1.4.1.1 Mode d'action du benzo(a)pyrène dans la cancérogenèse

Durant la phase I, les CYP1A1 et CYP1B1 oxydent le B(a)P et forment initialement les catabolites époxydes et les diol-époxydes du B(a)P dont certains sont des cancérigènes ultimes. Ceux-ci se lient de façon covalente aux sites nucléophiles de l'ADN, généralement au niveau du groupe 2-amino de la guanine pour former l'adduit (+)-trans-anti-BPDE-N2-dG responsable de mutations au niveau des bases G:C (Nagalingam *et al*, 2005). La liaison covalente se fait aussi au niveau de l'adénine dans le groupement amino N6 (Ling *et al*, 2004).

Les adduits à l'ADN du B(a)P peuvent conduire à des mutations qui provoquent le cancer. Parmi, les métabolites réactifs et mutagènes du B(a)P on retrouve les (+)-7R,8S,9S,10R-anti-benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE), (+)-anti-BPDE et le (-)-7S,8R,9R,10S énantiomère, (-)-anti-BPDE (Miller *et al*, 2001) (Figure 4). Les altérations de l'ADN se produisent par la liaison en position C10 de l'anti-BPDE et à la position N2 de la guanine. Ainsi, 4 stéréoisomères d'adduits sont formés : le 10S (+)- trans-anti-BPDE-N2-dG, le 10R (+)-cis-anti-BPDE-N2-dG, le 10R (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG et le 10S (-)-cis-anti-BPDE-N2-dG (Zhao *et al*, 2006). Ces derniers compromettent la réplication de l'ADN en particulier le 10S (+)- trans-anti-BPDE-N2-dG qui perturbe la structure en double hélice et bloque les ADN polymérases induisant ainsi des mutations (Ling *et al*, 2004; Hsu *et al*, 2005). Cependant certaines ADN polymérases de la famille Y contournent l'adduit [BP]dG durant la réplication *in vitro* (Hsu *et al*, 2005). Ce contournement peut être non mutagène ou

mutagène selon le type de polymérase. La polymérase (Pol) κ provoque une réplication fidèle après contournement de l'adduit BPDE-dG, alors que la Pol η induit une réplication infidèle en insérant un nucléotide à l'opposé de la lésion (error-prone replication) (Ling *et al*, 2003 ; Zhao *et al*, 2006). La Pol ι insert fidèlement le dTMP à l'opposé de l'adduit BPDE-dA mais requiert la Pol κ pour mettre en place les amorces afin de compléter la réplication après la lésion (Ling *et al*, 2003).

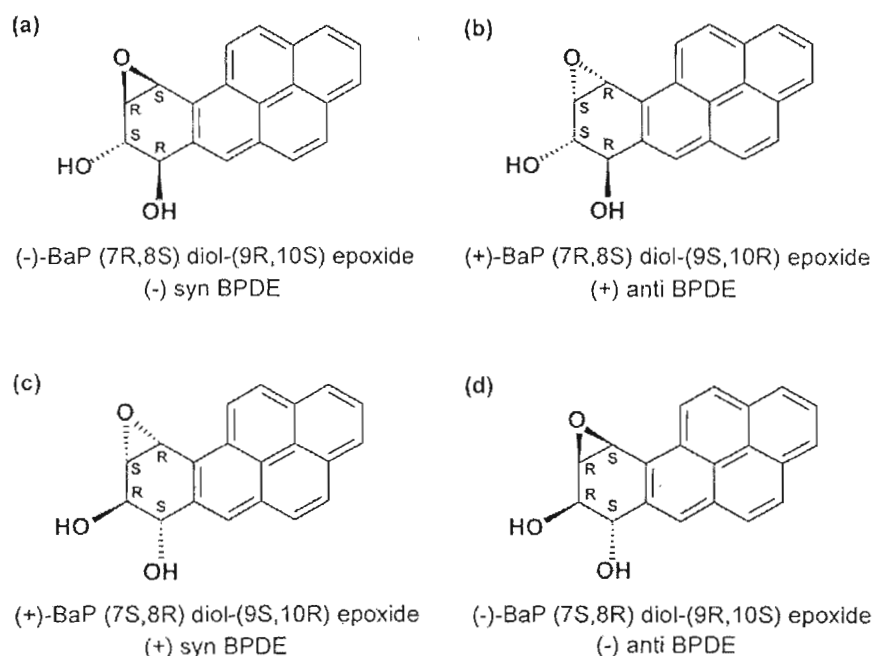


Figure 4. Structure chimique des 4 stéréo-isomères d'adduits BPDE-ADN (tiré de Miller *et al*, 2001).

Concernant la formation d'adduits à l'ADN, il a été démontré que le métabolite diol époxyde (7,8 diol-9,10-époxyde) en est principalement responsable lors de traitement de cultures cellulaires d'embryons d'hamsters (Sims *et al*, 1974) et de fibroblastes (Daudel *et al*, 1975) au B(a)P. On a aussi observé la formation d'adduits avec les acides nucléiques au niveau de

la peau de souris, des kératinocytes humains ainsi que les hépatocytes de rat, une réaction qui était principalement reliée au métabolite 9-hydroxy-4,5-époxyde (Jernstrom et al, 1984).

Les adduits sont aussi responsables de la formation de tumeurs chez la souris (Buening *et al*, 1978). En plus des adduits, le BPDE-2 induit l'apoptose chez les cellules de type HepG2 (Chen *et al*, 2003). Le (+)-trans-anti-BPDE-N2-dG résiste à la réparation par le NER (nucleotide excision repair) contrairement au (+)-cis-anti-BPDE-N2-dG qui lui est réparé par ce dernier (Jia *et al*, 2009). La résistance à la réparation de l'ADN, ainsi qu'une synthèse translesionnelle à travers l'adduit volumineux provoque, une transversion (mutation qui engendre le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique, ou vice versa) des bases G→T (Luch, 2005). Les transversions G→T sont associées au cancer du poumon chez les fumeurs.

D'autres mécanismes mutagènes peuvent être la cause de développement de cancers. En effet, les adduits formés par le B(a)P peuvent provoquer des mutations ou altérations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogène comme le RAS (Luch, 2005). Ceci contribue à la transformation de cellules normales en cellules tumorales (Luch, 2005). Ce processus est appelé l'initiation tumorale en carcinogénèse. Le B(a)P agit aussi via un récepteur nucléaire (récepteur *Aryl Hydrocarbon*) qui favorise l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la prolifération cellulaire. Le B(a)P est aussi impliqué dans la promotion tumorale (Luch, 2005).

1.4.1.2 Mode d'action du B(a)P via le récepteur *Aryl Hydrocarbon*

La présence de HAP dans le cytoplasme engendre une induction spécifique d'enzymes métabolisant les xénobiotiques. *L'Aryl hydrocarbon Receptor* (AhR), un récepteur cytoplasmique qui a une grande affinité pour le B(a)P (Figure 5), se lie à diverses protéines cytoplasmiques telles que les Heat shock protein 90 (Hsp90). La liaison de l'AhR à l'Hsp 90 permet au récepteur cytoplasmique de reconnaître de manière spécifique les HAP.

Dès son entrée dans la cellule, le B(a)P se lie à l'AhR. Ceci provoque le détachement du Hsp 90 et permet à l'AhR d'aller vers le noyau. Il en résulte ainsi une accumulation nucléaire du complexe B(a)P-AhR. Toujours dans le cytosol ce complexe se lie à l'*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT).

Ce nouveau complexe forme un hétérodimère qui joue dans le noyau le rôle de facteur de transcription. En se liant au récepteur XRE (xenobiotique response element), il induit l'expression de plusieurs enzymes dont la mono-oxygénase P450 de la famille 1A et certains isoformes de la GST. Il affecte aussi l'expression de différents facteurs et gènes :

- 1) Des facteurs impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire comme l'activateur et l'inhibiteur du plasminogène type 1 (PAI1), la métallothionéine II (MT-II), le HEF1 (human enhancer of filamentation 1), la GEF (guanine nucleotide exchange factor), la COT ou MAP3K8 (Mitogen-activated protein kinase 8) et l'oncogène KRAS (Luch, 2005) (Figure 6).
- 2) Des facteurs proapoptotiques comme le TNF (tumor necrosis factor, (superfamilles 3, 6, 8, 9, 10)) et la HSP40 (heat-shock protein 40) sont réprimés (Luch, 2005) (Figure 6).
- 3) Des gènes jouant un rôle dans le cycle cellulaire des cellules sont surexprimés (ex : cycline B2) ou réprimés (ex : la NEK2). L'initiation tumorale se fait après la formation d'adduit à l'ADN qui engendre des altérations au niveau du gène suppresseur de tumeur TP53 (tumor protein 53) ou de l'oncogène RAS (Luch, 2005) (Figure 6).

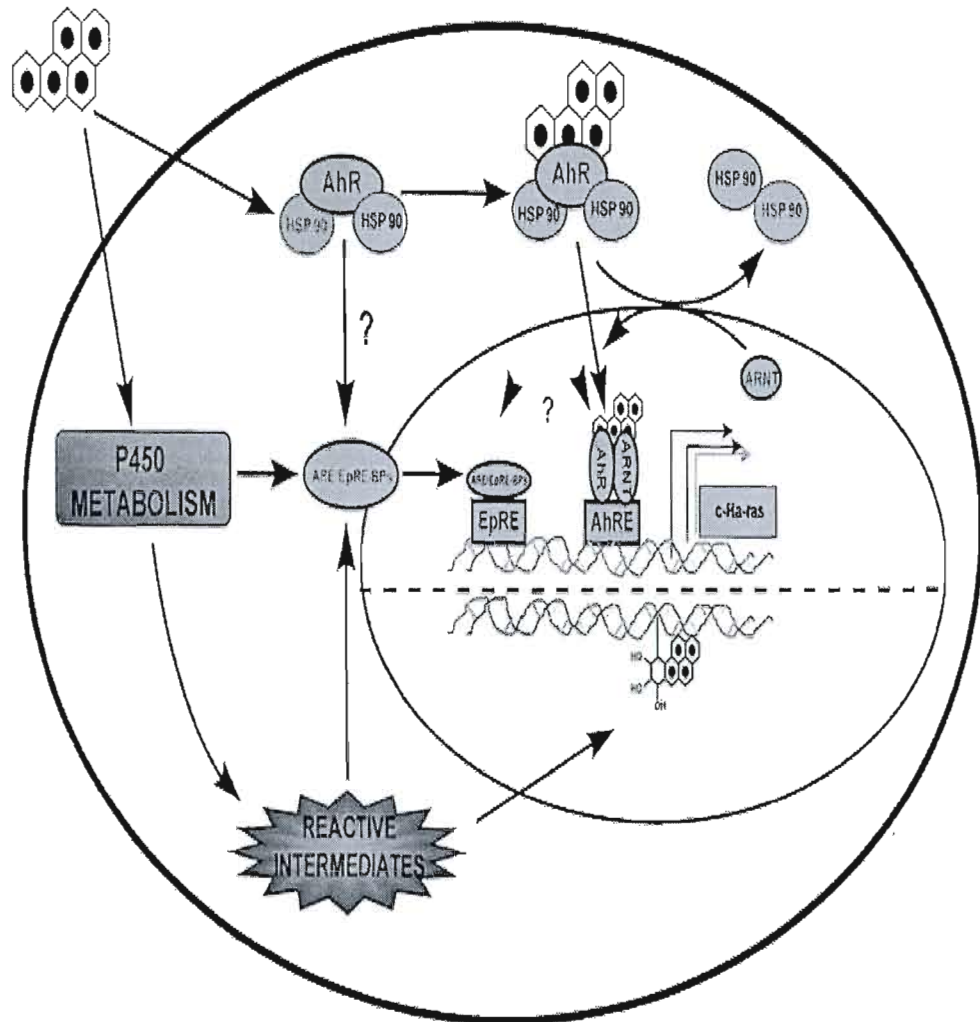


Figure 5. Mode d'action du B(a)P via le récepteur *Aryl Hydrocarbon* (tiré de Miller *et al*, 2001).

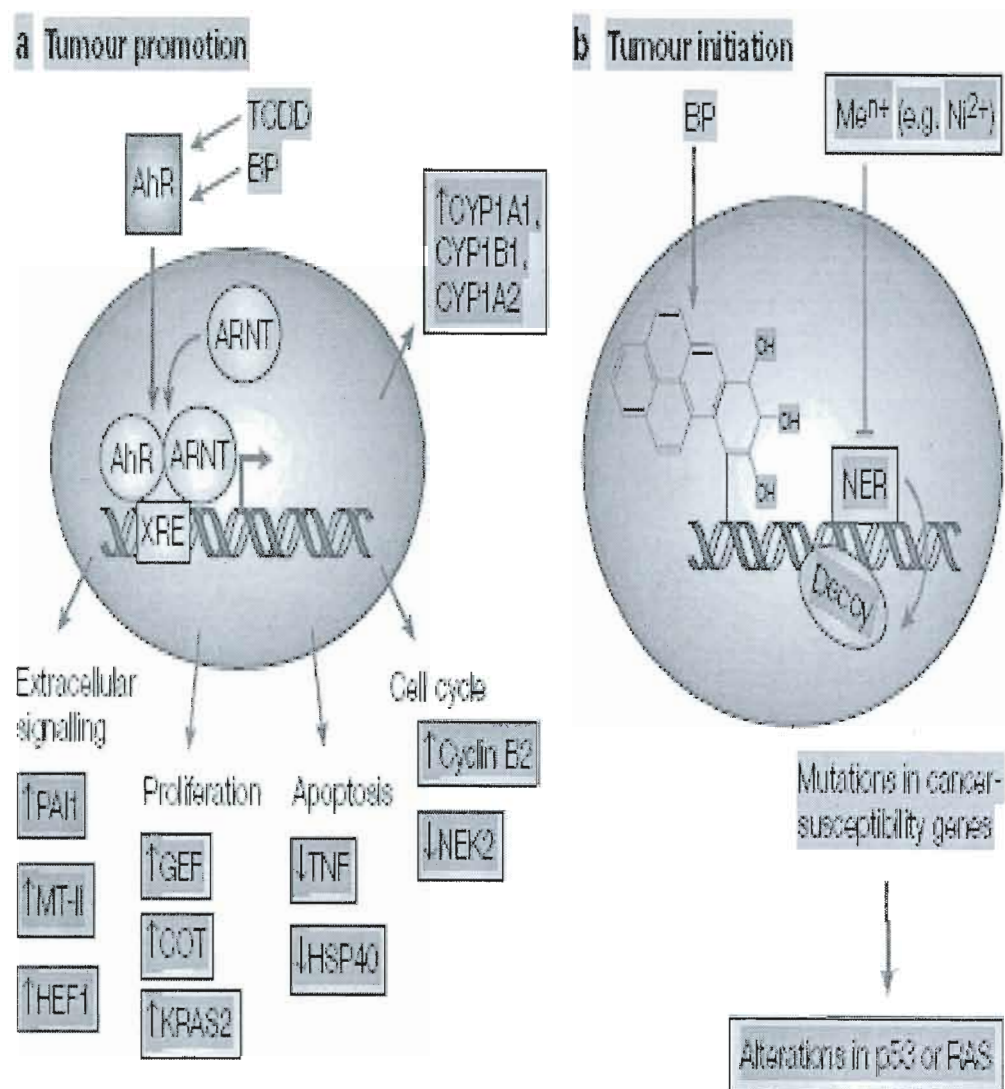


Figure 6. Mécanisme d'action du B(a)P (tiré de Luch, 2005).

1.4.1.3 Les profils de mutations

Des mutations du RAS sont souvent observées dans les cancers humains provoqués par des carcinogènes chimiques (Luch, 2005). Le KRAS est aussi souvent affecté par l'anti-BPDE. Son codon 12 est fréquemment muté dans différents cancers humains et démontre un taux de réparation réduit suite à la formation d'adduit à l'ADN (Luch, 2005). La méthylation au niveau des CpG au voisinage du codon 12 du KRAS n'a aucune influence sur la liaison de l'anti BPDE au niveau de ce site, alors que la présence de la 5-méthylcytosine accroît de manière significative la liaison anti-BPDE aux résidus guanine au niveau du gène TP53 (Luch, 2005). Il a été mis en évidence une association entre la transversion G→T et le cancer du poumon chez les fumeurs. Lors de cette transversion, l'adduit anti-BPDE-N2-dG est produit exclusivement au niveau des dinucléotides méthylés CpG de l'ADN non transcrit (Luch, 2005).

1.4.2 Autres effets pathologiques du benzo(a)pyrène

Dépendamment de la voie d'exposition, le B(a)P provoque différentes pathologies. Il peut causer des lésions au niveau du rein ainsi que des perturbations sur les profils sériques immunologiques (p.ex. : réduction d'immunoglobines sérique IgG, IgA, IgM et augmentation de IgE sérique) (Szczeklik *et al*, 1994). De fortes doses orales (120 mg/kg/jour chez la souris) provoquent des altérations au niveau de la muqueuse gastro-intestinale par réduction de l'activité de la carboxylestérase (Nousiainen *et al*, 1984), des effets hématopoïétiques sévères, de la néphrotoxicité et des effets sur la reproduction (Mackenzie et Angevine, 1981; Nousiainen *et al*, 1984).

1.5 B(a)P et interactions médicamenteuses

Des études antérieures ont démontré l'existence d'interactions entre certains médicaments et le B(a)P (Zevin *et al*, 1999). Cependant, l'information existante sur l'augmentation de la génotoxicité au B(a)P induite par des interactions médicamenteuses est infime car on retrouve dans la littérature peu d'études consacrées à ce sujet. On est cependant sûr que certains médicaments, en interagissant avec le métabolisme du B(a)P et/ou de ses métabolites, peuvent augmenter de manière significative la cancérogénicité de ces HAP. Par exemple (Myllynen *et al*, 2006) on démontré que certains médicaments comme le probénécide peuvent augmenter la formation d'adduits BPDE-ADN. Plus récemment, Koul *et al*, (2009) ont mis en évidence que le celecoxib, un anti-inflammatoire non stéroïdien augmente, la formation d'adduits BPDE-ADN au niveau des tissus pulmonaires de la souris (Koul *et al*, 2009).

La principale voie de détoxification de l'ultime carcinogène (+)-anti-BPDE est la glutathion-S-transférase qui catalyse la conjugaison avec la GSH (Myllynen *et al*, 2006). Une fois conjugués, ces composés sont éliminés de la cellule par les transporteurs membranaires MRP2. Le probénécide (famille des sulfonamides) agit sur le métabolisme du B(a)P en réduisant les taux de GST et de MRP2. Il augmente aussi le taux de 7,8-diol-BP en diminuant la glucuronoconjugaison (Myllynen *et al*, 2006).

1.5.1 Choix des médicaments

Le choix des médicaments sélectionnés pour cette étude prend en compte leur grande consommation par la population canadienne. Il tient compte aussi de la biotransformation du B(a)P ainsi que les différentes enzymes impliquées dans sa biotransformation. Nous savons que certains des médicaments ont un potentiel d'interférer dans une ou plusieurs voies métaboliques du B(a)P, voire dans le processus de réparation de l'ADN lors de la formation d'adduits B(a)P (favorisant ou inhibant la réparation). Par exemple, il est connu que la théophylline (broncho-dilatateur) est un inducteur de la CYP1A2 (Fukami *et al*, 2007).

Aussi le naproxène réduit l'activité des glutathion-S-transférases (Orhan et Sahin 2001) et l'acétaminophène est conjugué directement par glucuronidation et sulfatation (Davern *et al*, 2006). Il serait aussi intéressant d'étudier leur influence sur le métabolisme des HAP. De plus, l'acide salicylique est un inhibiteur compétitif de la sulfotransférase (Vietri *et al*, 2001).

Le manque d'information sur les voies métaboliques de certains médicaments ou le fait qu'ils n'empruntent pas les mêmes voies que le B(a)P ne nous permet pas d'assumer que des interactions n'auront pas lieu. C'est donc pour cette raison que nous avons retenus certains médicaments pour lesquels aucune voie métabolique identifiée ne recoupe celles du B(a)P. Ces médicaments sont largement utilisés dans la population canadienne et souvent de façon chronique.

1.5.1.1 Métabolisme des médicaments choisis

Acétaminophène : Ce médicament est métabolisé dans le foie principalement par les voies de la glucuronidation et de la sulfatation. Une petite partie (environ 5%) est transformée par les CYP2E1/1A2/3A4 en NAPQI (*N*-acetyl-benzoquinoneimine) qui en l'absence de glutathion, se lie de manière covalente à des groupements cystéine des protéines hépatocytaires formant ainsi des adduits qui peuvent être libérés dans le sang. La formation de ces adduits représente une étape irréversible dans la toxicité hépatique (Davern *et al*, 2006).

Ibuprofène : L'ibuprofène est principalement métabolisé par oxydation dans le foie par le CYP2C9 (90%) et le CYP2C19 (10%) (Dermot *et al*, 2005). Ses principaux métabolites sont le 2-hydroxyibuprofène et le 2-carboxyibuprofène (Mills *et al*, 1973; Vangiessen and Kaiser, 1975). Les enzymes impliquées dans la glucuronidation sont les UGTs 1A3, 1A9 (qu'on retrouve dans le métabolisme du B(a)P) et les UGT 2B4 et 2B7 (Kuehl *et al*, 2005).

Naproxène : Ce composé est métabolisé principalement dans le foie en 6-*o*-déméthylnaproxène par la CYP 2C9, 1A2 et C19 (McGinnity *et al*, 1999). Ce métabolite et le produit mère empruntent la voie de la glucuronidation (Segre *et al*, 1975). Les UGT

impliquées sont les UGT 1A3, 1A9, 1B4, et 1B7 (Gwendolyn *et al*, 2005). Il a été observé que le naproxène réduit l'activité des glutathion-S-transférases dans les globules rouges (Orhan et Sahin 2001).

Acide méfénamique : L'acide méfénamique emprunte deux voies métaboliques différentes : la voie oxydative par le cytochrome 2C9, ou la voie de la glucuronidation (Karen *et al*, 1996). Les métabolites de la voie oxydative sont aussi glucuronidés (Karen *et al*, 1996).

Gliclazide : Le gliclazide est métabolisé par une série d'oxydation par la CYP2C9 et 2C19 (Elliot *et al*, 2007). Sept métabolites hydroxylés sont formés (les 4a, 4o, 5, 6a, 6i, 7a, et 7fi mono-hydroxy-azabicyclooctyl) (Taylor *et al*, 1996).

Carbamazépine : La biotransformation de la carbamazépine se fait via 4 voies. La principale est oxydative et conduit à la formation de l'époxyde de carbamazépine, soit la carbamazépine-10,11-époxyde (CBZ-E), la 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine (10-OH-CBZ), la 3-hydroxycarbamazépine (3-OH-CBZ), la 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine (10,11-D) et un autre métabolite non-identifié. L'époxyde de carbamazépine est ensuite éliminé par hydrolyse sous forme de diol qui est à son tour glucuronoconjugué (Amore *et al*, 1997).

Acide valproïque : La biotransformation de l'acide valproïque se fait via les 4 voies suivantes : la β - et la ω -1 oxydation, la glucuronidation et la voie du cytochrome P450 (Wong *et al*, 2000).

Acide salicylique : L'acide salicylique est le métabolite primaire de l'aspirine. Il est un inhibiteur compétitif de la sulfotransférase (Vietri *et al*, 2001). Il est le substrat de la CYP3A (Voloshchuk *et al*, 2005) et est conjugué au niveau du foie en acide salicylurique (par la conjugaison à la glycine), en composé glucuronique phénolique et enfin en acylglucuronide. Les UGT impliqués sont 1A1, 1A3, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7 (Kuehl *et al*, 2006).

Théophylline : La théophylline subit une 8-hydroxylation et une 3-déméthylation par la CYP1A2, 2A13. Les 6% restants sont N-méthylés en caféine (Fukami *et al*, 2007).

1.6. Méthodes pour mesurer le pouvoir mutagène des génotoxiques

1.6.1 Méthodes cellulaires

1.6.1.1 Le test de Ames

Différentes méthodes peuvent mesurer le pouvoir mutagène des xénobiotiques, tel que le B(a)P. Certaines méthodes permettent la mesure du pouvoir d'un xénobiotique à redonner le phénotype normal pour certains caractères phénotypiques mutés. Par exemple, les souches de *Salmonella typhimurium* (TA100 et T98) dans le test d'Ames ont été préalablement mutées pour devenir auxotrophe à l'histidine. Des mutations subséquentes induites par des xénobiotiques rendent ces dernières prototrophes à l'histidine, leurs conférant ainsi, la capacité de se multiplier dans un milieu dépourvu d'histidine (Maron et Ames, 1983). D'autres tests ayant le même principe de mutations renversées existent, tel le SOS chromatest (Quillardet et Hofnung, 1993).

1.6.1.2 Le test des comètes

Le test des comètes mesure les cassures provoquées directement par un agent génotoxique. La mesure des cassures peut se faire aussi de manière indirecte pendant les processus enzymatiques de réparation des dommages ou sinon lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN comme l'apoptose. Ce test permet d'établir la relation dose-effet. Il utilise la technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose de cellules isolées. Une fois l'électrophorèse terminée, les noyaux d'ADN cassés prennent l'apparence de comète. Les noyaux d'ADN non endommagés restent ronds (Wilkening *et al*, 2003).

1.6.1.2 Méthodes analytiques

Au lieu des mesurer la mutagenèse il est possible aussi de mesurer directement le taux d'adduits formés sur l'ADN en mesurant le taux d'adduit par radiomarquage (Kim et Lee 1997). Les adduits à l'ADN formés sont mesurés par un compteur de radioactivité. Les comptes résultants sont ensuite normalisés en pmol/mg d'ADN.

Il existe aussi la méthode de spectrométrie de masse en tandem pour mesurer les adduits à l'ADN après l'extraction et la digestion de l'ADN. Dans cette méthode la chromatographie se fait en utilisant une colonne C8 à phase inverse. La mesure des adduits à l'ADN peut se faire en mode d'ions positifs qui utilise différentes méthodes de détection des réactions. Les adduits mesurés sont exprimés en nombre d'adduits à l'ADN par million de nucléotides normaux (Marie et al, 2008). Cette méthode mesure les masses spectrométriques des complexes guanine-BPDE et adénine-BPDE.

CHAPITRE II

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET *MATÉRIELS ET MÉTHODES*

2.1 Objectifs et hypothèses de travail

Étant donné que l'état des connaissances actuelles qui a mis en évidence l'existence d'interactions entre produits pharmaceutiques et les HAP et que certains médicaments utilisent les mêmes voies métaboliques et/ou les mêmes cofacteurs que pour le métabolisme du B(a)P. Nous émettons les hypothèses suivantes :

1. Ces interactions sont directement reliées à la capacité du système enzymatique hépatocytaire de former des métabolites actifs du B(a)P qui causent des adduits à l'ADN.
2. Ces interactions sont le produit d'une modulation du taux de formation d'un métabolite, soit par inhibition des enzymes de la phase 2 (SULT, GST, et/ou UGT) ou induction de la phase 1 (CYP1A1/1A2/3A4/1B1).
3. La co-exposition à certains des médicaments sélectionnés a le potentiel d'augmenter ou de diminuer le pouvoir cancérigène du B(a)P.

Ce projet de recherche a donc pour objectif (i) d'identifier les interactions potentiellement toxiques du B(a)P, et des médicaments qui sont largement consommés dans notre population (i.e., médicaments utilisés pour certaines maladies chroniques ou utilisés sans prescription

médicale) en mesurant le taux de formation d'adduit chez les hépatocytes humains de la lignée HepG2 (carcinome hépatocellulaire humain).

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Produit chimiques et réactifs

La solution mère de 7,10-¹⁴C-B(a)P (activité spécifique de 50 mCi/mmol) a été commandée chez GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Le MEM (Minimum Essential Medium) contenant du L-glutamine and pyruvate, le sérum de veau fœtal, la trypsine et la pénicilline –streptomycine servant à la culture cellulaire ont été achetés chez Gibco (Grand Island, NY). Le PBS provient de chez Fisher (Portsmouth, États-Unis) alors que le DMSO vient de Caledon Laboratories (Georgetown, Canada).

2.2.2 Culture cellulaire

La lignée d'hépatocytes cancéreux humains HepG2 utilisée dans cette étude nous a été fournie par le laboratoire du Dr. Catherine Mounier (Département des sciences biologiques, Université de Québec à Montréal). Les HepG2 sont mis en culture dans des flacons de 25 cm² contenant du MEM avec du L-glutamine (4 mM), 10% de sérum de veau fœtal v/v, de la pénicilline (100 U ml⁻¹) et de la streptomycine (100 U ml⁻¹). Le tout est mis dans un incubateur à 37° C et à 0,5 % de CO₂.

3.2.3 Détection des adduits

La détection de la liaison du B(a)P à l'ADN (i.e : adduits BPDE-ADN) a été déterminée par comptage à scintillation, c'est à dire par une méthode radiométrique. Dans cette technique des HepG2 ont été incubés pendant un temps déterminé. Les différents temps d'incubations choisis ont permis de mettre en place une courbe cinétique de la formation des adduits ADN-B(a)P radiomarké. Une concentration de 30 µM a été utilisée pour les groupe contrôle (groupes sans médicament) et les groupes traités (groupes avec médicaments). La concentration de médicament a été déterminée à partir des concentrations sanguines

maximales thérapeutiques (C_{max}) rapportées dans la littérature. Ces concentrations ont été fixés à 10 fois la (C_{max}) observée chez les humains exposés aux doses thérapeutiques suggérées (Tableau I). Ce choix de concentration repose sur le fait qu'une interaction médicamenteuse est plus facilement détectable si la concentration de l'inhibiteur (dans ce cas le médicament) au site actif est plus grande que sa constante d'inhibition (K_i). La mesure du taux d'adduit s'est faite à partir d'ADN extrait des cellules HepG2 exposées. La détection des adduits par radiométrie est une méthode sensible (radiodétection) rapide et simple à utiliser. Comme il a été établi que le B(a)P se lie de façon covalente à l'ADN après avoir été bioactivé (Kim *et al*, 1997), on a utilisé une méthode radiométrique utilisant du 7,10- ^{14}C -B(a)P. L'augmentation des adduits induite par les médicaments sera observée chez des hépatocytes incubés avec du 7,10- ^{14}C -B(a)P seul ou en présence de médicament sélectionné.

2.2.4 Préparation du B(a)P

La solution mère de 7,10- ^{14}C -B(a)P utilisée pour les incubations est à l'origine dissoute dans du toluène. Pour éviter toute toxicité cellulaire émanant de ce dernier, on prélève le volume de B(a)P dont on a besoin de la solution stock, on évapore tout le toluène à l'aide d'un jet d'azote (99 % de pureté) et on resuspend la substance dans un volume équivalent de DMSO.

2.2.5 Détermination de la viabilité

Un échantillon de 10 μL de suspension cellulaire est dilué dans 40 μL de bleu de trypan à 0.4% (p/v). Un volume de 10 μL de ce mélange est étalé sur un hémocytomètre de Neubauer pour comptage au microscope. Le pourcentage de viabilité doit être supérieur à 85%.

2.2.6 Exposition cellulaire au benzo(a)pyrène

2.2.6.1 Détermination de la cinétique de formation des adduits

Une fois à confluence (densité de 2×10^6 cellule/ml), les HepG2 ont été exposées à $30 \mu\text{M}$ de $7,10\text{-}^{14}\text{C-B(a)P}$ (Figure 7) dans des flacons de 25 cm^2 contenant uniquement 4 ml MEM. Les temps d'incubation choisis étaient respectivement de 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h et 48 h. Des triplicatas furent effectués pour chaque temps d'incubation. Une fois l'incubation terminée, le milieu de culture a été éliminé, les cellules ont été rincées à quatre reprises au PBS froid, puis incubées à 37°C pendant 5 min dans $700 \mu\text{l}$ de trypsine. Une fois décollées de la paroi du flacon, elles ont été resuspendues dans 4 ml de MEM. Enfin, elles ont été soumises à une centrifugation à $10000 \times g$ pendant 15 min puis par la suite le MEM a été éliminé : A cette étape, le culot cellulaire est prêt pour l'extraction d'ADN génomique : (500 μl) est utilisée pour doser les protéines et le reste pour l'exaction d'ADN).

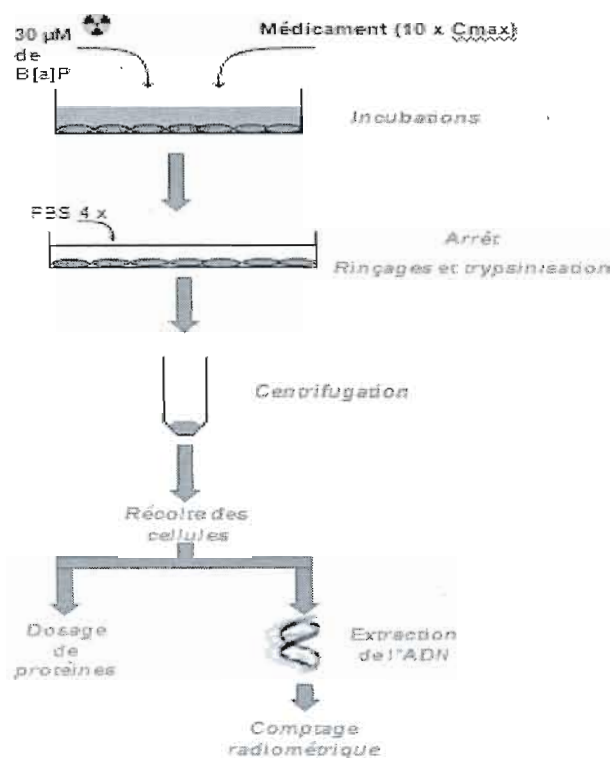
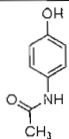
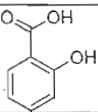
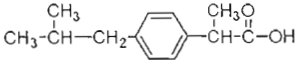
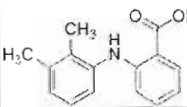
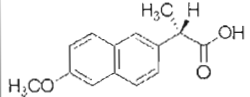
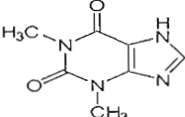
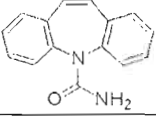
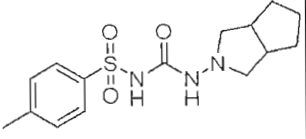


Figure 7. Schéma représentant la méthode utilisée pour la détection des adduits à l'ADN de B(a)P radiomarqué.

2.2.6.2 Co-incubation en présence de médicaments

Une fois à confluence (densité de 2×10^6 cellule/ml), les HepG2 mis en culture dans des flacons de 25 cm^2 contenant uniquement 4 ml MEM, sont exposées à $30 \mu\text{M}$ de $7,10\text{-}^{14}\text{C}$ -B(a)P seul (contrôle) ou en présence d'un des médicaments pendant 6 h à 37°C . Pour chaque échantillon, on utilise des triplicatas. Les concentrations de médicaments choisies sont de 10 fois la C_{max} en dosage thérapeutique rapporté dans la littérature (Tableau I). Une fois l'incubation terminée, on répète les mêmes étapes citées pour la détermination de la cinétique des adduits qui conduiront à l'extraction de l'ADN génomique (Figure 7).

Tableau I. Concentration maximale à dose thérapeutique des médicaments.

Médicaments	Structure chimique	C _{max} plasmatique (μM)	Références
Acétaminophène		60	APC 2009
Acide salicylique		490	Brantmark <i>et al.</i> (1982)
Ibuprofène		50	De Brabander <i>et al.</i> (2000)
Acide méfénamique		29	Neuvonen et Kivisto (1988)
Naproxène		374	Mroszczak <i>et al.</i> (1988)
Théophylline		111	
Acide valproïque	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCOO}^- \text{Na}^+$	481	Hussein <i>et al.</i> (1994)
Carbamazépine		38	Loonen <i>et al.</i> (1989) Miller et Ludden (1993)
Gliclazide		46	Davis <i>et al.</i> (2000)

2.2.7 Extraction de l'ADN génomique

Selon la procédure du kit Flexigene DNA Kit 50 ml de Qiagen, l'ADN est isolé à partir des cellules lysées au SDS. La protéinase K et l'ARNase sont utilisées respectivement pour dégrader les protéines et l'ARN. L'ADN est précipité avec de l'isopropanol (100%) et rincé à l'éthanol (70%). L'ADN précipité est dissout dans 3 ml de tampon TRIS-E à pH de 7,5 et incubé à 65°C pendant une heure.

2.2.8 Dosage de protéines

La méthode de Bradford (Bradford, 1976) est utilisée pour le dosage de protéine. Elle se base sur l'adsorption du réactif bleu de Coomassie G250. Ce colorant s'adsorbe en milieu méthanolique acide, sur les protéines et le complexe formé provoquant un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. C'est une méthode très rapide et très sensible (2-5 µg de protéines).

2.2.9 Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN est déterminée par absorbance UV à 260 nm et 280 nm à l'aide du spectrophotomètre (Bio Mate3, Thermo Scientific). Le ratio de pureté A_{260}/A_{280} d'ADN doit être compris entre 1,8 et 1,9 dans tous les échantillons.

2.2.10 Dosage radiométrique

Après l'extraction de l'ADN génomique, 1 ml d'ADN dissout est prélevé, puis est mis dans un vial dans lequel on ajoute 10 ml de liquide à scintillation (chaque échantillon correspondant aux temps d'incubations suivants, 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h est compté en

triplicata). La liaison covalente $7,10^{-14}\text{C-B(a)P/ADN}$ est déterminée par un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2800 TR, Perkin Elmer) qui mesure les rayonnements bêta émis durant 2 min de lecture. Le taux d'adduit est estimé en pmol $7,10^{-14}\text{C-B(a)P}$ métabolites liés par mg de protéine.

2.2.11 Traitement des données et analyse statistique

L'étude statistique a été effectuée grâce au logiciel SigmaStat 3.1. Elle a consisté à décrire les séries avec les indices généraux correspondants aux : moyenne, écart-type-médiane, maximum et minimum.

Chaque groupe (témoins et traitements) est constitué de 3 échantillons ($n=3$). L'approche statistique abordée est le test t de student apparié. Cela permet de comparer les données d'un traitement (présence de B(a)P et médicament) par rapport à un témoin (présence de B(a)P seulement) et de vérifier quelles valeurs sont significativement différentes de la valeur témoin ($p<0,05$), c'est à dire les milieux sans co-exposition aux médicaments.

Les coups par minutes représentant la radioactivité mesurée dans les d'adduits sont normalisés en pmol/mg de protéine. C'est à dire que les CPM sont convertis en μCi puis ses dernières sont divisées par l'activité spécifique de la solution mère de B(a)P et le tout est multiplié par 1000000. Le résultat obtenu est divisé par la quantité de protéine totale dosée par la méthode de Bradford.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Cinétique de formation des adduits

La concentration choisie pour la détermination de la cinétique de formation d'adduits BPDE-ADN est de 30 μ M de B(a)P. Cette concentration est adéquate, car : (i), elle permet la formation d'adduits tout en maintenant une viabilité de plus de 90% pour les HepG2 incubées au B(a)P, (ii) elle permet de former un nombre d'adduits détectable par radiométrie.

D'après le profil de la courbe cinétique obtenu (Figure 8), on constate chez les hépatocytes, que les niveaux d'adduits augmentent après 3 h et atteignent leurs maximums à 24 h et 48 h de traitement. Généralement, après 24 h et 48 h les taux d'adduits BPDE-ADN tendent à diminuer (Marie *et al.*, 2008). En se basant sur cette cinétique de formation d'adduits BPDE-ADN, une durée de 6 h d'incubation a été choisie comme temps de référence pour l'étude des interactions médicaments-B(a)P. En choisissant cette période d'incubation, on minimise l'impact de la réparation et de l'élimination de la mesure des adduits. On vise essentiellement à vérifier l'impact des médicaments sur la formation d'adduits. Effectivement, ce temps d'incubation se trouve entre le début de formation d'adduits à l'ADN et l'après 48 h qui correspond à la période d'élimination des adduits ainsi qu'à la réparation de l'ADN (Kushman *et al.* 2007; Marie *et al.* 2008).

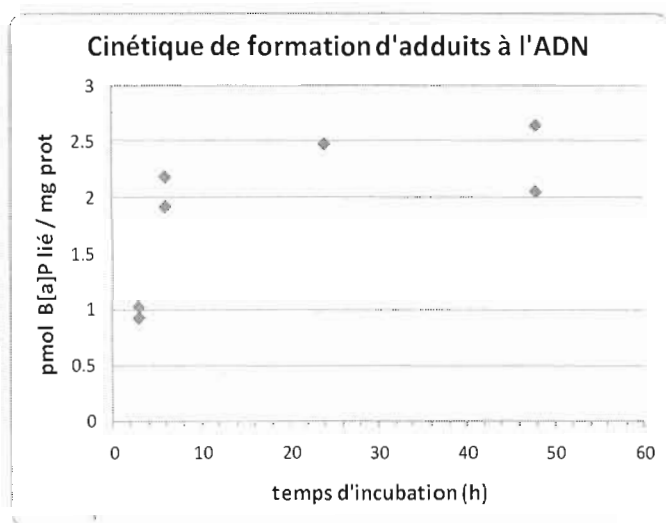


Figure 8. Cinétique de formation d'adduits à l'ADN lors d'incubation cellulaire avec du 7,10-¹⁴C B(a)P (30 μ M). Chaque point représente une incubation (n=2).

3.2 Identification des interactions métaboliques

Sur la vingtaine de médicaments initialement sélectionnés, l'acétaminophène, l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, l'acide méfénamique, le naproxène, l'acide valproïque, le carbamazépine, le gliclazide, et la théophylline sont ceux dont nous avons investigué leur possible interaction sur la génotoxicité du B(a)P. Chaque colonne dans l'histogramme représenté dans la figure 9 correspond à trois échantillons par traitement (n=3). Le ratio est normalisé par la moyenne du contrôle lors d'une même journée d'expérience.

Après coexposition des cellules au B(a)P et à chacun des médicaments pendant 6h, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (naproxène, ibuprofène et acide méfénamique) se comportent de manière différente par rapport à leur contrôle respectif (i.e, cellules exposées au B(a)P seulement) (Figure 9). Dans le cas du naproxène, le test t de Student donne une différence significative pour les deux derniers passages (32 et 42) ($p=0,006$ et $p=0,0016$) (Tableau II). Les ratios des deux derniers passages sont inférieurs à 1 (Figure 9). Ils confirment ainsi l'existence d'une différence en terme de formation d'adduits à l'ADN entre le contrôle et l'échantillon traité au naproxène plus B(a)P.

Le test de t a relevé une différence significative pour l'acide méfénamique pour les passages 1 et 3 (i.e., 30^e et 45^e passage) ($p=0,05$ et $p=0,010$) et un ratio inférieur à 1 (Figure 9). Ceci suggère une baisse du taux de formation d'adduits à l'ADN en présence de ce médicament dans les conditions de coexposition au B(a)P telles qu'utilisées.

L'ibuprofène quant à lui, présente une différence significative ($p=0,008$) pour le 45^{ème} passage). Cependant, contrairement aux deux médicaments précédents le ratio du dernier passage est supérieur à 1 (Figure 9). Le nombre d'adduits à l'ADN confirme une hausse par rapport au taux d'adduits à l'ADN retrouvé chez le contrôle.

Pour la classe d'analgésiques/antipyrétique (acétaminophène et acide salicylique), l'hypoglycémiant (gliclazide), les antiépileptiques (acide valproïque et carbamazépine), et le bronchodilatateur (théophylline), il n'y'a aucune différence significative par rapport à leurs contrôles respectifs. La probabilité p est supérieure à 0,05 pour tous les passages (Tableau II).

L'analyse des moyennes des concentrations de protéines pour les échantillons traités aux médicaments par un test de T n'a révélé aucune différence significative quant aux contenus protéiques des cellules HepG2 ($p<0,05$, Tableau III).

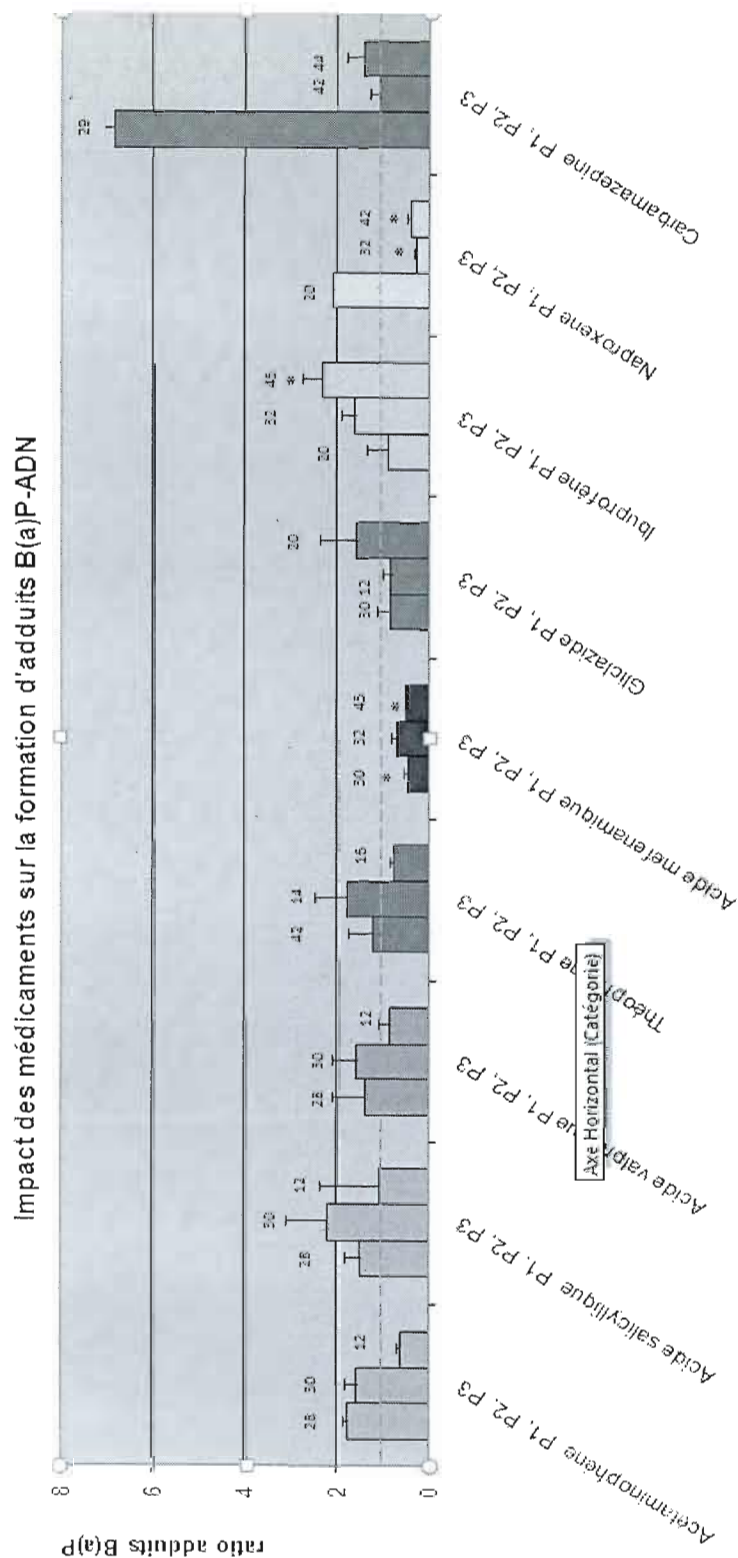


Figure 9. Impact de la présence de médicaments sur la formation d'adduits à l'ADN après 6 h d'incubation. La concentration des médicaments correspond à 10 x la Cmax à dose thérapeutiques. Chaque barre représente trois échantillons par traitements (n=3) et le ratio représente les valeurs des traitements/ les valeurs des contrôles d'expérience (La ligne en tiret représente le ratio 1). Chaque trois histogrammes d'une même couleur qui se suivent représentent les passages respectifs de la lignée HepG2 (numéros au dessus de chaque histogramme). Le niveau de confiance est de 95%.

Tableau II. Test de T non apparié entre les cellules traitées au 7,10 ¹⁴C B(a)P (contrôles) et les cellules traitées au 7,10 ¹⁴C B(a)P plus le médicament. . Le niveau de confiance est de 95%. (NA : pas assez d'échantillons).

Médicaments	Test t de Student		
	Passage 1	Passage 2	Passage 3
Naproxène	NA	0,006*	0,016*
Ibuprofène	P>0,05	0,063	0,008*
Acide méfénamique	0,05*	P>0,05	0,001*
Acétaminophène	NA	NA	P>0,05
Acide salicylique	NA	NA	P>0,05
Acide valproïque	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Carbamazépine	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Théophylline	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Gliclazide	P>0,05	P>0,05	P>0,05

*passages pour lesquels des interactions ont été observées au niveau de la formation d'adduit.

Tableau III. Concentrations (\pm écart-type) en protéines des milieux d'incubation lors de co-exposition aux médicaments qui ont révélé des interactions.

Médicaments	Moyennes des dosages des protéines (mg/ml)		
	Naproxène	Ibuprofène	Acide méfénamique
Passage 1	2,31 \pm 0.20	2,08 \pm 0.30	1,00* \pm 0.20
Passage 2	1,95* \pm 0.15	1,06 \pm 0.15	1,10 \pm 0.12
Passage 3	1,46* \pm 0.17	0,53* \pm 0.1	1,24* \pm 0.18

*passages pour lesquels des interactions ont été observées au niveau de la formation d'adduit.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

La multiplication de la consommation de médicaments dans la dernière décennie dans le monde industrialisé et l'ubiquité du benzopyrène dans l'environnement rendent inévitable les coexpositions entre eux. Il est donc important d'identifier les combinaisons médicaments-B(a)P les plus susceptibles de provoquer des changements dans le taux de formation d'adduit B(a)P-ADN.

La lignée cellulaire HepG2 métabolise le B(a)P et des adduits BPDE-ADN sont formés (Marie *et al*, 2008). Elle constitue aussi un modèle fiable pour l'étude de carcinogènes tel que le B(a)P (Wilkening *et al*, 2003). Dans cette étude on a testé neuf médicaments largement consommés par la population canadienne. Le raffinement de la méthode expérimentale a permis l'obtention de la cinétique de la formation d'adduits à l'ADN ainsi que l'investigation des interactions médicamenteuses.

4.1 Raffinement de la méthode

Au cours de cette étude, certaines modifications en rapport avec le B(a)P radioactif, l'extraction et la dissolution de l'ADN ont été apportées au niveau expérimental.

La solution mère de $7,10\text{-}^{14}\text{C}$ B(a)P était à l'origine dissoute dans du toluène. Elle rendait ainsi le taux de mortalité des HEPG2 incubées au B(a)P très élevé, élévation due à la

présence de toluène dans le milieu de culture. Il a donc fallut évaporer le toluène à l'azote et dissoudre le 7,10-¹⁴C B(a)P dans du DMSO.

L'ADN extrait à partir d'un flacon de 25 cm² était très concentré et cela posait un problème lors de sa dissolution. Le Tris-E seul ne constituait pas un moyen efficace pour dissoudre l'ADN. Pour éviter de contaminer le sonicateur avec de la radioactivité, la sonication n'a pu être réalisée. C'est seulement en utilisant des seringues avec des aiguilles de différents diamètres (25 G ^{5/8}, 21 G 1 et 21 G 1^{1/2}), que l'ADN génomique s'est dissout, permettant par la suite son dosage spectrophotométrique à A₂₆₀/A₂₈₀ et donnant des ratios de pureté variant entre 1,8 et 1,9, ce qui représente un bon ratio (Kim *et al*, 1997).

La comparaison des comptes CPM d'adduits normalisés par des pmol/ mg de protéine à ceux normalisés par des pmol/ mg d'ADN sont presque identiques ceci implique que la méthode de normalisation par quantité de protéines est aussi fiable que celle qui utilise la quantité d'ADN. Cependant la normalisation des comptes CPM en pmol/ mg d'ADN a été faite que pour les deux derniers passages pour chaque médicament (sauf pour la théophylline ou on a fait trois passages).

Pour les échantillons traités au 7,10-¹⁴C B(a)P en présence de naproxène ou de carbamazépine, le compte de la radioactivité augmentait de façon inexplicable 24h (t=0 correspond au compte effectué juste après l'ajout du liquide à scintillation) après l'ajout du liquide de scintillation. En effet, 24h après le premier compte de radioactivité on passait de 6842 à 37144 CPM (coups par minute) et de 621 à 6213 CPM pour le naproxène et la carbamazépine (Figure 9), respectivement. Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous avons mis dans différents vials du B(a)P radioactif seul ou en présence de médicament (naproxène ou carbamazépine). Pour affirmer ou infirmer si l'augmentation de comptes était due au modèle de liquide à scintillation utilisé, nous avons testé deux marques commerciales de liquide à scintillation distinctes. L'observation des comptes de radioactivité à t=0 et à 24 h après l'ajout des liquides de scintillation n'affichait aucune différence significative pour le naproxène et la carbamazépine prouvant ainsi que ni le liquide à scintillation, ni le médicament n'étaient à l'origine de l'augmentation des comptes. Une dissolution inadéquate

de l'ADN pourrait être à l'origine de l'augmentation des comptes. On a pensé que la différence entre le temps 0 et 24 h était due à la mauvaise dissolution de l'ADN, ce n'était finalement pas le cas. En effet, une fois l'ADN dissout on a été incapable de reproduire ses variations importantes de radioactivité.

4.2 Cinétique de formation des adduits

Selon (Misaki *et al*, 2007), l'expression des cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1 se trouve amplifiée après une incubation avec 30 μ M de B(a)P chez les cellules HepG2. Cette amplification accélérerait la formation d'adduits à l'ADN. Dans la présente étude, les adduits à l'ADN augmentent avec le temps, atteignant les valeurs de 0.14 pmol/mg protéine à 0 h, 1 pmol/mg de protéine à 3 h, 2 pmol/mg de protéine d'ADN à 6h, un maximum de 2,5 pmol/mg de protéine à 24 h, et enfin 2,3 pmol/mg de protéine à 48 h. Les concentrations d'adduits à l'ADN entre 3 à 6 h d'incubation et entre de 6 à 24 h ont respectivement augmenté d'un facteur de 2 et de 1,25. Ces facteurs se rapprochent des valeurs 1,5 et 1,27 retrouvées dans l'étude de Kim *et al.* (1997) faite avec des hépatocytes primaire de rat. Les BPDE sont les métabolites qui se lient de façon covalente à l'ADN pour former l'adduit. On estime qu'il faudrait en moyenne 100 000 molécules de B(a)P pour former un adduit et que seulement 1% de B(a)P est transformé en BPDE chez les HEPG2 (Marie *et al*, 2008). Ceci pourrait expliquer la faible teneur en adduits obtenue dans la cinétique d'adduits. Comme la formation d'adduits est linéaire et dose-dépendante (Marie, *et al*, 2008), il se pourrait aussi que la faible teneur en adduit obtenue dans notre étude soit le résultat d'une faible concentration en B(a)P d'adduits. Sachant que juste 1% du B(a)P est converti en BPDE et en comparant notre étude à celle de Marie *et al* (2008) on constate que le nombre d'adduits dans la deuxième étude augmente de manière significative à partir d'une concentration de 100 μ M alors qu'à 30 μ M le niveau d'adduits formés reste faible. Ceci dit, on a réussi à mesurer les taux d'adduits et à reproduire la méthode de mesure de ces derniers. L'utilisation d'une plus forte concentration de B(a)P aurait peut-être donné un changement plus significatif et

reproductif dans l'altération du taux de formation d'adduits à l'ADN lors des tests d'interactions.

Il faut aussi souligner que le taux de formation d'adduits diffère d'une lignée cellulaire à une autre, et ceci peut être expliqué par les différents potentiels enzymatiques des cytochromes P450 1A1 et 1A2 à oxyder le B(a)P (Ledirac *et al*, 1997), ou bien par la différence des niveaux d'expressions ou d'affinité des récepteurs Ah qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des cytochromes P450 1A1 et 1A2 (Swanson, 2004).

Après 24 h, les cellules HepG2 exposées au B(a)P voient leur taux d'adduits à l'ADN diminué. Ceci est probablement dû en grande partie au NER (nucleotide excision repair) qui est impliqué dans la réparation des adduits à l'ADN (Luch, 2005). La cinétique de réparation dans la lignée HepG2 est monophasique et lente (Marie *et al*, 2008).

4.3 Interactions médicamenteuses

La présente étude nous a permis d'identifier des interactions entre le B(a)P et la classe des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. En effet, des interactions ont été observées lors de la co-exposition au B(a)P et aux médicaments suivants : le naproxène, l'acide méfénamique et l'ibuprofène. Ces interactions tendent soit à augmenter les adduits à l'ADN du B(a)P en potentialisant la génotoxicité de ce dernier, soit en jouant un rôle protecteur en diminuant les taux d'adduits à l'ADN qui pourrait se traduire par une baisse de la génotoxicité du B(a)P.

Dans le cas du naproxène, nous avons remarqué qu'au niveau des passages 2 et 3 (figure 9) la diminution d'adduits BPDE-ADN par rapport aux contrôles était significative. Ces résultats suggèrent que le naproxène pourrait jouer un rôle protecteur en diminuant les taux d'adduits à l'ADN. Le naproxène, à dose thérapeutique réduit l'activité des glutathion-S-transférases dans les globules rouges (Orhan et Sahin, 2001). Contrairement à ce qui nous nous

attendions, une diminution d'adduits a été observée. Il faudrait investiguer davantage afin de comprendre le mécanisme causant cette réduction d'adduit. Il est possible qu'en augmentant la concentration du B(a)P on observerait de plus grande variations dans les taux d'adduits. La diminution du taux d'adduit pourrait être due aussi au déclenchement des mécanismes de réparation de l'ADN.

En présence d'acide méfénamique, il a été démontré dans la présente étude que le taux d'adduit diminuait significativement par rapport aux contrôles dans les passages 1 et 3 (figure 9) avec des valeurs de p de 0,05 et 0,001, respectivement (Tableau II). Ceci plaiderait en faveur de l'existence d'interactions métaboliques entre le B(a)P et l'acide méfénamique. En effet, l'acide méfénamique est un inhibiteur de l'UGT1A9 (Omura *et al*, 2007) principale enzyme impliquée dans la glucuronidation du benzo(a)pyrene-trans-7R,8R-dihydrodiol, métabolite qui peut former des adduits à l'ADN s'il n'est pas conjugué. Or, dans notre cas, il s'agit bel et bien d'une diminution du taux d'adduits à l'ADN que nous avons observée et non d'une élévation. Nous pourrions donc être amenés à penser que cet abaissement du taux d'adduits BPDE-ADN serait dû finalement à une inhibition partielle des cytochromes P450 en général et de la CYP1A2 en particulier. En effet une étude a démontré que 100 μ M d'acide méfénamique provoquait l'inhibition de plus de 80% du CYP1A2 au niveau des hépatocytes ($K_i = 3,47 \mu$ M) (Karjalainen *et al*, 2008). La CYP1A2 est l'enzyme prédominante de phase I dans le foie intervenant dans le métabolisme du B(a)P (Shimada *et al*, 2006). Elle est aussi, avec la CYP1A1, l'enzyme majoritairement responsable de la formation de pro-carcinogènes pendant la biotransformation du B(a)P (Shimada *et al*, 2007; Ma *et al*, 2007) donc si la CYP1A2 est inhibée cela pourrait être la cause de la diminution du taux d'adduit dans le cas de l'acide méfénamique.

L'ibuprofène augmente le taux d'adduits BPDE-ADN chez les HepG2 au passage 3 (figure 9). Le test t de Student révèle une différence significative entre les témoins et les échantillons traité à l'ibuprofène avec une probabilité p de 0,008. Les enzymes impliquées dans la glucuronidation de l'ibuprofène sont les UGTs 1A3, 1A9 (on les retrouve dans la glucuronidation du B(a)P) (Kuehl *et al*, 2005). On pourrait expliquer l'augmentation de ces adduits par l'inhibition des UGTs 1A1 et 1A9 qu'exercerait l'ibuprofène sur la

glucuronidation des métabolites réactifs du B(a)P, par l'induction des enzymes de phase I (CYP1A2), ou enfin par la diminution des mécanismes de réparation de l'ADN pour les deux dernières explications nous ne disposons pas d'éléments de littératures qui viendraient les appuyer.

En s'appuyant sur les données suivantes, nous nous attendions à ce que la carbamazépine et l'acide salicylique en présence de B(a)P provoquent une augmentation des taux d'adduits à l'ADN chez les HepG2. La carbamazépine est glucuronidée chez l'humain par l'isoforme UGT2B7 (Staines *et al*, 2004). Une inhibition compétitive au niveau des UGT aurait pu diminuer la glucuronidation des BPDE issues du métabolisme du B(a)P et ainsi causer une augmentation du taux d'adduits à l'ADN. De plus, la principale voie de détoxification de l'ultime carcinogène, le (+) – anti BPDE (benzo(a)pyrène-diol-époxyde), est la glutathion-S-transférase qui catalyse la conjugaison avec la GSH (Myllynen *et al*, 2006). Le fait que la CBZE (carbamazépine époxyde métabolite issue de l'oxydation de la carbamazépine) se lie de manière covalentes au GSH (Bu *et al*, 2005) aurait pu se mener à une déplétion des réserves cellulaires du GSH et diminuer la détoxification du BPDE et ainsi provoquer une augmentation du taux d'adduits à l'ADN. Le test t de Student n'aurait révélé aucune différence significative ($p > 0,05$) pour l'augmentation d'adduits provoquée par la carbamazépine.

Certains dérivés du B(a)P-hydroxylés sont sulfoconjugués, et l'acide salicylique est connu pour être un inhibiteur des sulfotransférases (Vietri *et al*, 2001). Cette inhibition pourrait aussi augmenter le taux de BPDE-ADN chez les HepG2 traitées au B(a)P et à l'acide salicylique. La figure 9 démontre que la carbamazépine et l'acide salicylique augmentent le taux d'adduits à l'ADN respectivement pour les passages 1, 2, 3, et 1, 2 (figure 9). Cependant, le test t de Student n'a révélé aucune différence significative ($p < 0,05$) pour cette augmentation.

Pour le gliclazide, l'acide valproïque, la théophylline et l'acétaminophène, le test de t n'a révélé aucune différence significative quant à de variation d'adduits par rapport a leurs

contrôles respectifs ce qui implique la non existence d'interactions métaboliques entre le B(a)P et ces trois médicaments.

Pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène, naproxène et acide méfénamique), l'existence d'interactions avec le B(a)P a été démontrée pour les passages 3, 2-3 et 1-3 (figure 9) ($p < 0,05$). Cependant, ces interactions ne se sont produites que sur un réplica biologique pour l'ibuprofène, et deux réplicas dans le cas du naproxène et de l'acide méfénamique (Figure.8 et Tableau II). Les HepG2 peuvent perdre leur activité métabolique pendant leurs proliférations et après plusieurs passages (Wilkening *et al*, 2003). Cette perte d'activité métabolique totale ou partielle influencerait aussi bien le pool de cytochromes P450 (1A1 et 1A2, les enzymes responsables de la biotransformation du B(a)P) les enzymes de phase II (responsables de la détoxification) ainsi que les niveaux d'expression des récepteurs AhR qui sont responsables de l'induction de cytochromes P450 (Luch, 2005). Il faut aussi prendre en considération que, vu leur caractère tumoral, les HepG2 peuvent avoir des défaillances au niveau des voies de l'activation et/ou de la transcription du AhR-XRE (Zeiger *et al*, 2001). Tout cela, pourrait expliquer l'absence d'interactions dans les passages qui n'ont montré aucune différence significative avec leurs contrôles respectifs (cas de l'ibuprofène, le naproxène et l'acide méfénamique). Ceci expliquerai peut être la hausse d'adduits à l'ADN pour le 29^e passage de la carbamazépine par rapport aux deux autres passages rendant ainsi la différence non significative ($p > 0,05$). De plus, il faudrait aussi investiguer s'il n'existerait pas des fluctuations dans les réserves en cofacteurs (GSH, PAPS, UDPGA) chez les HepG2 lors d'un passage à un autre.

En résumé, l'anti-inflammatoire non-stéroïdien ibuprofène augmente significativement le taux d'adduits BPDE-ADN chez les HepG2 au passage 3 (figure 9) ($p = 0,008$) alors que pour l'acide méfénamique et le naproxène les taux d'adduits diminué (respectivement passage 30 et 45 et passage 32 et 42) (figur 9).

Chez ces anti-inflammatoires non stéroïdiens étudiés (ibuprofène, naproxène et acide méfénamique), les mécanismes d'interactions pourraient être le résultat d'une induction des

enzymes de phase I, d'une inhibition des enzymes de phase II, ou d'une diminution des mécanismes de réparation de l'ADN.

On sait maintenant que la liaison covalente du B(a)P à l'ADN est une étape critique dans la carcinogenèse. Les adduits à l'ADN qui ne peuvent être réparés forment des lésions pré-néoplasiques qui donnent naissance à des transformations néoplasiques (Miller *et al*, 2001). Les adduits peuvent aussi provoquer des mutations ou des altérations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogène comme le RAS. Ils créent ainsi un déséquilibre au niveau du contrôle de la prolifération cellulaire. Les oncogènes stimulent par la suite la prolifération cellulaire. L'absence de gènes suppresseurs fonctionnels est un élément indubitable de la cancérisation. Cette perte de fonctionnalité contribue à la transformation de cellules normales en cellules tumorales (Luch, 2005, 2006). Ce processus est appelé l'initiation tumorale en carcinogenèse. Le B(a)P agit aussi via un récepteur nucléaire (récepteur AhR) qui favorise l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la prolifération cellulaire. Il participe donc aussi dans la promotion tumorale dans le cas où le B(a)P provoque des mutations irréversibles.

La présence d'interactions entre le B(a)P et les anti-inflammatoires non stéroïdien : ibuprofène, naproxène et l'acide méfénamique n'est pas fortuite. Il a été démontré dans des études antérieures que les AINS modulaient l'activité enzymatique des cytochromes P450 intervenant dans le métabolisme de carcinogènes (Ciolino et al, 2006). Par exemple, le celecoxib un AINS, module la biotransformation des carcinogènes en réduisant leurs activations et en activant leurs détoxification. Le celecoxib, en présence de produits de la fumée de cigarette réduit considérablement le taux d'adduit à l'ADN dans le foie de souris (Koul et al, 2009).

4.4 Conclusion

Les résultats de cette étude ont démontré que la consommation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens peut moduler la toxicité du B(a)P chez la lignée HepG2. Il est donc important de caractériser de telles interactions et de prendre ces co-expositions en considération dans

l'analyse du risque lié à une exposition à ce polluant. Ces interactions sont d'autant plus importantes pour les populations susceptibles, notamment les personnes qui consomment des anti-inflammatoires non stéroïdien de façon chronique ou chez les individus pour qui le métabolisme de phase II est défaillant. Pour compléter l'étude, il serait important de caractériser les combinaisons démontrant une interaction en déterminant les paramètres cinétiques (i.e, vitesse maximale de métabolisme, constante d'affinité et constantes d'inhibition). Il serait d'intérêt d'étoffer l'étude avec des investigations au niveau de la cinétique de réparation de l'ADN. Les données obtenues dans cette étude pourraient contribuer à ouvrir la voie vers une amélioration de l'évaluation du risque toxicologique du B(a)P pour les personnes exposées à celui-ci en milieu occupationnel et prenant des anti-inflammatoires et aussi, pour des sous-populations spécifiques particulièrement exposées comme les fumeurs traités chroniquement par des AINS.

BIBLIOGRAPHIE

- Amore BM, Kalhorn TF, Skiles GL, Hunter AP, Bennett GD, Finnell RH, Nelson SD, Slattery JT (1997). Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity. *Drug Metabolism and Disposition* 25(8):953-62.
- Bartosek I, Guaitani A, Modica R, Fiume M, Urso R (1984). Comparative kinetics of oral benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats: study with hydrocarbon mixtures. *Toxicology Letters* 23(3):333-9.
- Bertrand JP, Chau N, Patris A, Mur JM, Pham QT, Moulin JJ, Morviller P, Auburtin G, Figueredo A, Martin J (1987). Mortality due to respiratory cancers in the coke oven plants of the Lorraine coalmining industry (Houillères du Bassin de Lorraine). *British Journal of Industrial Medicine* 44(8):559-65.
- Bisson M, Diderich R, Dujardin R, Hulot C, Lacroix G, Lamy M.H, Lefevre JP, Leveque S, Magaud H, Tissot S (2006). Benzo(a)pyrène. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques version n°2-3.
- Bonnard M, Brondeau M.T, Clavel T, Falcy M, Jargot D, Lafontaine M, Reynier M, Schneider O (2007). Benzo(a)pyrène. INRS fiche toxicologique FT 144.
- Bort R, Macé K, Boobis A, Gómez-Lechón MJ, Pfeifer A, Castell J (1999). Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology* 58(5):787-96.
- Bradford M M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brantmark, B., Wahlin-Boll, E., Melander, A. (1982). Bioavailability of acetylsalicylic acid and salicylic acid from rapid-and slow-release formulations, and in combination with dipyridamol. *Eur J Clin Pharmacol* 22: 309-314.
- Bu HZ, Deese AJ, Zhao P, Pool WF (2005). Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and pharmacologically active metabolite of carbamazepine. *Drug Metabolism and Disposition*. 33(12):1920-4.

- Buening MK, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Thakker DR, Akagi H, Koreeda M, Jerina DM, Conney AH (1978). Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(11):5358-61.
- Busbee DL, Norman JO, Ziprin RL. (1990). Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology* 64(4):285-90.
- Cavalieri E, Rogan E (1985). Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 64:69-84.
- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, Tukey RH (2003). The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278(21):19526-33.
- Ciolino HP, MacDonald CJ, Memon OS, Bass SE, Yeh GC. (2006). Sulindac regulates the aryl hydrocarbon receptor-mediated expression of Phase I metabolic enzymes in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*, 27(8):1586-92.
- Csala, M., Staines, A. G., Banhegyi, G., Mandl, J., Coughtrie, M. W., Burchell, B. 2004. Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 68: 1353-1362.
- Daudel P, Duquesne M, Vigny P, Grover PL, Sims P (1975). Fluorescence spectral evidence that benzo(a)pyrene-DNA products in mouse skin arise from diol-epoxides. *FEBS Letters* 57(3):250-3.
- Davern TJ 2nd, James LP, Hinson JA, Polson J, Larson AM, Fontana RJ, Lalani E, Munoz S, Shakil AO, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group (2006). Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. *Gastroenterology* 130(6):1933.
- Dermot F, McGinnity DF, Tucker J, Trigg S, Robert J. Riley RJ (2005). Prediction of CYP2C9-mediated drug-drug interactions: a comparison using data from recombinant enzymes and human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 33:1700–1707.
- Elliot DJ, Suharjono, Lewis BC, Gillam EM, Birkett DJ, Gross AS, Miners JO (2007). Identification of the human cytochromes P450 catalysing the rate-limiting pathways of glimepiride elimination. *British Journal of Clinical Pharmacology* 64(4):450-7.

- Fang JL, Lazarus P (2004). Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 13(1):102-9.
- Fukami T, Nakajima M, Sakai H, Katoh M, Yokoi T (2007). CYP2A13 metabolizes the substrates of human CYP1A2, phenacetin, and theophylline. *Drug Metabolism and Disposition* 35(3):335-9.
- Gaudoneix-Taieb M., Beauverie P, Poisson N (2001). Tabac et médicaments : liaisons dangereuses ? *Alcoologie et addictologie* 23(1):7-12.
- Grover PL. Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons (1986). *Xenobiotica*. 16(10-11):915-31. Review.
- Hsu GW, Huang X, Luneva NP, Geacintov NE, Beese LS (2005). Structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a benzo[a]pyrene adduct that blocks replication. *The Journal of Biological Chemistry* 280(5):3764-70.
- Hussein, Z., Mukherjee, D., Lamm, J., Cavanaugh, J. H., Granneman, G. R. (1994). Pharmacokinetics of valproate after multiple-dose oral and intravenous infusion administration: gastrointestinal-related diurnal variation. *J Clin Pharmacol* 34: 754-759.
- l'Institut Canadien d'Information sur la santé (2010). Dépenses en médicaments au Canada, de 1985 à 2009.
- Jernström B, Vadi H, Orrenius S (1978). Formation of DNA-binding products from isolated benzo[a]pyrene metabolites in rat liver nuclei. *Chemical Biological Interactions* 20(3):311-21.
- Jia L, Kropachev K, Ding S, Van Houten B, Geacintov NE, Broyde S (2009). Exploring damage recognition models in prokaryotic nucleotide excision repair with a benzo[a]pyrene-derived lesion in UvrB. *Biochemistry*.48(38):8948-57.
- Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM (2007). Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 20(9):1331-41.
- Karjalainen MJ, Neuvonen PJ, Backman JT (2008). In vitro inhibition of CYP1A2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids: predictability of in vivo interactions. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 103(2):157-65.
- Kim HS, Lee BM. (1997). Inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller. *Carcinogenesis* 18(4):771-6.

- Koul A, Tanwar L, Arora N (2009). Celecoxib administration exhibits tissue specific effect on 3H-benzo(a)pyrene-DNA adduct formation in cigarette smoke inhaling mice; 47(2):83-90.
- Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J (2005). Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 33(7):1027-35.
- Kuehl GE, Bigler J, Potter JD, Lampe JW (2006). Glucuronidation of the aspirin metabolite salicylic acid by expressed UDP-glucuronosyltransferases and human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 34(2):199-202.
- Kushman ME, Kabler SL, Fleming MH, Ravoori S, Gupta RC, Doehmer J, Morrow CS, Townsend AJ (2007). Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo[a]pyrene or benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1. *Carcinogenesis*. 28(1):207-14.
- Loonen, A. J., Toll, P. J., Nijdam, J. R. 1989. A comparison of carbamazepine divitabs with carbamazepine normal formulation in psychiatric and oligophrenic patients. Preliminary pharmacokinetic results. *Pharm Weekbl Sci* 11: 23-26.
- N. Ledirac, C. Delescluse, G. de Sousa, M. Pralavorio, P. Lesca², M. Amichot³, J. B. Bergé³ and R. Rahmani⁴ (1997). Carbaryl Induces CYP1A1 Gene Expression in HepG2 and HaCaT Cells but Is Not a Ligand of the Human Hepatic Ah Receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144(1):177-82.
- Ling H, Sayer JM, Plosky BS, Yagi H, Boudsocq F, Woodgate R, Jerina DM, Yang W (2004). Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proceeding of the National Academy of Sciences United States of America* 101(8):2265-9.
- Luch A (2006). The mode of action of organic carcinogens on cellular structures. *EXS*; (96):65-95.
- Luch A (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Review, Cancer* 5(2):113-25.
- Ma Q, Lu AY (2007). CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug metabolism and disposition* 35(7):1009-16.
- MacKenzie KM, Angevine DM (1981). Infertility in mice exposed in utero to benzo(a)pyrene. *Biology of Reproduction* 24(1):183-91.
- Maron DM, Ames BN (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 113(3-4):173-215.

- Marie C, Maître A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, Favier A, Ravanat JL (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol*. 28(5):579-90.
- McGinnity DF, Griffin SJ, Moody GC, Voice M, Hanlon S, Friedberg T, Riley RJ (1999). Rapid characterization of the major drug-metabolizing human hepatic cytochrome P-450 enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Drug Metabolism and Disposition* 27(9):1017-23
- McGinnity DF, Waters NJ, Tucker J, Riley RJ (2008). Integrated in vitro analysis for the in vivo prediction of cytochrome P450 mediated drug-drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* 36(6):1126-34.
- McGurk KA, Remmel RP, Hosagrahara VP, Tosh D, Burchell B (1996). Reactivity of mefenamic acid 1-o-acyl glucuronide with proteins in vitro and ex vivo. *Drug Metabolism and Disposition* 24(8):842-9.
- Miller, R. et Ludden, T. M. 1993. Bioavailability of controlled release carbamazepine estimated by mixed effect modelling. *Eur J Clin Pharmacol* 44: 231-235.
- Miller KP, Ramos KS (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab Rev.*;33(1):1-35.
- Ministère de l'Environnement de l'Ontario. Review of benzo[a]pyrene. Occurrence, human exposure and health effects. Rédigé par Canviro Consultants Ltd., Kitchener et Toronto (1985).
- Mroszczak, E., Yee, J. P., Bynum, L. (1988). Absorption of naproxen controlled-release tablets in fasting and postprandial volunteers. *J Clin Pharmacol* 28: 1128-1131.
- Myllynen P, Kurttila T, Vaskivuo L, Vähäkangas K (2006). DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxicology Letters* 69(1):3-12.
- Nagalingam A, Seo KY, Loechler EL (2005). Mutagenesis studies of the major benzo[a]pyrene N2-dG adduct in a 5'-TG versus a 5'-UG sequence: removal of the methyl group causes a modest decrease in the [G->T/G->A] mutational ratio. *Mutagenesis* 20(2):105-10.
- Neuvonen, P. J. et Kivisto, K. T. 1988. Effect of magnesium hydroxide on the absorption of tolfenamic and mefenamic acids. *Eur J Clin Pharmacol* 35: 495-501.
- Nicolas JM, Whomsley R, Collart P, Roba J (1999). In vitro inhibition of human liver drug metabolizing enzymes by second generation antihistamines. *Chemico Biological Interactions* 123(1):63-7.

- Nousiainen U, Törrönen R, Hänninen O (1984). Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicology* 32(3):243-51.
- Omura K, Nakazawa T, Sato T, Iwanaga T, Nagata O (2007). Characterization of N-glucuronidation of 4-(5-pyridin-4-yl-1H-[1,2,4]triazol-3-yl) pyridine-2-carbonitrile (FYX-051): a new xanthine oxidoreductase inhibitor. *Drug Metabolism Disposition* 35(12):2143-8
- Orhan H., Sahin, G (2001). In vitro effects of NSAIDS and paracetamol on oxidative stress-related parameters of human erythrocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53(2-3) 133-140.
- Picard N (2005). Études in vitro et in vivo du métabolisme du mycophénolate et des interactions métaboliques entre médicaments immunosuppresseurs.
- Picard N, Cresteil T, Djebli N, Marquet P (2005). In vitro metabolism study of buprenorphine: evidence for new metabolic pathways. *Drug Metabolism and Disposition* 33(5):689-95.
- Quillardet P, Hofnung M (1988). The SOS Chromotest, a colorimetric assay based on the primary cellular responses to genotoxic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 34:817-25.
- Ramesh A, Inyang F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, Nyanda AM (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 53(4):275-90.
- Ribeiro O, Kirkby CA, Hirom PC, Millburn P (1985). Secondary metabolites of benzo[a]pyrene: 3-hydroxy-trans-7,8-dihydro-7,8-dihydroxybenzo[a]pyrene, a biliary metabolite of 3-hydroxybenzo[a]pyrene in the rat. *Carcinogenesis* 6(10):1507-11.
- Richert L, Binda D, Hamilton G, Viollon-Abadie C, Alexandre E, Bigot-Lasserre D, Bars R, Coassolo P, LeCluyse E (2002). Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicology In Vitro*. 2002 Feb;16(1):89-99.
- Ritchie KJ, Henderson CJ, Wang XJ, Vassieva O, Carrie D, Farmer PB, Gaskell M, Park K, Wolf CR (2007). Glutathione transferase pi plays a critical role in the development of lung carcinogenesis following exposure to tobacco-related carcinogens and urethane. *Cancer Research* 67(19):9248-57.
- Schwarz D, Kisselev P, Roots I (2003). St.John's Wort extracts and some of their constituents potently inhibit ultimate carcinogen formation from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1. *Cancer Research* 63: 8062-8068.

- Segre EJ (1975). Naproxen metabolism in man. *Journal of Clinical Pharmacology* 15(4 Pt. 2):316-23.
- Shimada T (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21(4):257-76.
- Shimada T, Murayama N, Okada K, Funae Y, Yamazaki H, Guengerich FP(2007). Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* 20(3):489-96.
- Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, Hewer A (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252(5481):326-8.
- Staines, A. G., Coughtrie, M. W., Burchell, B. 2004. N-glucuronidation of carbamazepine in human tissues is mediated by UGT2B7. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 1131-1137.
- Swanson HI (2004). Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chemico-Biological-Interactions* 149(2-3):69-79.
- Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D (1994). Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environmental Health Perspectives* 102(3):302-4.
- Taylor AR, Brownsill RD, Grandon H, Lefoulon F, Petit A, Luijten W, Kopelman PG, Walther B (1996). Synthesis of putative metabolites and investigation of the metabolic fate of gliclazide, [1-(3-azabicyclo(3,3,0)oct-3-yl)-3-(4-methylphenylsulfonyl) urea], in diabetic patients. *Drug Metabolism and Disposition* 24(1):55-64.
- Thyssen J, Althoff J, Kimmerle G, Mohr U (1981). Inhalation studies with benzo[a]pyrene in Syrian golden hamsters. *Journal of the National Cancer Institute* 66(3):575-7.
- Vietri M, Pietrabissa A, Mosca F, Rane A, Pacific GM. (2001). Human adult and foetal liver sulphotransferases: inhibition by mefenamic acid and salicylic acid. *Xenobiotica* 31(3):153-61.
- Voloshchuk NI, Pentiuk AA, Durnev AD (2005). Sex-related differences in the antinociceptive effect of some non-narcotic analgetics in rats: the role of biotransformation. *Eksperymental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya* 68(4):56-9.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(8):1035-42.

- Wong H, Kumar S, Rurak DW, Kwan E, Abbott FS, Riggs KW (2000). Ontogeny of valproic acid disposition and metabolism: a developmental study in postnatal lambs and adult sheep. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(8):912-9.
- Yamazaki H., Kakiuchi Y. (1989). The uptake and distribution of benzo[a]pyrene in rat after continuous oral administration. *Toxicol Environ Chem*, 24, 1/2, 95-104.
- Zevin S, Benowitz NL (1999). Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clinical Pharmacokinet* 36(6):425-38.
- Zeiger M, Haag R, Höckel J, Schrenk D, Schmitz HJ. (2001). Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicological Sciences* 63(1):65-73.
- Zhao B, Wang J, Geacintov NE, Wang Z (2006). Poleta, Polzeta and Rev1 together are required for G to T transversion mutations induced by the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG DNA adducts in yeast cells. *Nucle Acids Research* ;34(2):417-25.